



SELEX-Technologieentwicklung im Hochdurchsatz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von Diplom-Biologin
Tatjana Schütze
November 2011

Diese Arbeit wurde von April 2008 bis Januar 2011 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Abteilung Vertebratengenomik (Prof. Lehrach), in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Glökler (*Nucleic acid based technologies*) angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus (FU)
Prof. Dr. Hans Lehrach (MPI)

Disputation am 15.02.2012

Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M., Arndt, P.F., Glökler, J. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS ONE* 2011, Vol. 6 (12), e29604

Schütze, T. & Glökler, J. Tips and tricks of the trade: Idiot-proof emulsion PCR. *LabTimes* 2011; Vol. 5, 1, 50

Schütze, T., Rubelt, F., Repkow, J., Greiner, N., Erdmann, V. A., Lehrach, H., Konthur, Z., Glökler, J. A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical Biochemistry* 2011; Vol. 410, 1, 155-157

Schütze, T., Erdmann, V.A., Glökler, J. Kalibrierte Diversitätsbestimmung von Nukleinsäurebanken. *Laborwelt* 2010; Vol. 11, 1, 15-16

Schütze, T., Arndt, P.F., Menger, M., Wochner, A., Vingron, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Kaps, C., Glökler, J. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO — a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 2009; Vol. 38, e23

Abkürzungen

A	Adenin
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BP	Bindungspuffer
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CE-SELEX	Kapillarelektrophorese
D-	rechtsdrehend
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMC	Dimethycasein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	1,4-Dithiotreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAA	<i>Enzyme Linked Aptamer Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELONA	<i>Enzyme Linked Oligonucleotide Assay</i>
FLAA	<i>Fluorescence dye-linked aptamer assay</i>
FMN	Flavinmononukleotid
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gb	Gigabyte
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-Galactopyranose
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kV	Kilo Volt
L-	linksdrehend
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>
M	molar
Mb	Megabyte
MBP	maltosebindendes Protein
min	Minuten
Mio.	Millionen
N	Nukleotid (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , (Polymerase-Ketten-reaktion)
PEG	Polyethylenglykol
rd	Runde
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SA	Streptavidin
SDS	Natriumlaurylsulfat
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
T	Thymin
TEMED	N',N',N',N' - Tetramethylethylendiamin
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lsg.)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 In vitro-Selektion von Nukleinsäuren (SELEX)	2
1.2 Aptamere	4
1.3 Aptamere und ihre Anwendungen	7
1.3.1 Vergleich Aptamere und Antikörper	7
1.3.2 Nukleinsäuremodifikationen	8
1.4 Nukleinsäure-Bibliotheken und Diversitäten	9
1.5 Wasser-in-Öl-Emulsionen	11
1.6 Hochdurchsatzsequenzierungen der nächsten Generation – next-generation sequencing (NGS)	12
1.7 Zielstellung	13
2. Methoden	14
2.1 Systematische Evolution von Liganden durch Exponentielle Anreicherung (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	14
2.2.2 Emulsions-PCR	15
2.2.3 In vitro-Transkription (RNA-Synthese)	16
2.2.4 Reverse Transkription	16
2.2.5 RNA-Replikation mit Q β -Replikase.....	17
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	18
2.2.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren	18
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.2.9 Kovalente Kopplung von Nukleinsäuren an magnetische Partikel.....	19
2.2.10 Klonierung	19
2.2.11 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	20
2.2.12 Herstellung elektrokompetenter Zellen	20
2.2.13 Hitzeschock-Transformation	20
2.2.14 Transformation durch Elektroporation	21
2.2.15 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präp)	21
2.2.16 Sequenzierungsmethoden	21
2.3 Proteinbiochemische Methoden	22
2.3.1 Proteinexpression in Escherichia coli	22
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.3.3 Coomassieblaufärbung von Polyacrylamidgelen.....	23
2.3.4 Western Blot.....	23
2.3.5 Aptamer-basierte Affinitätschromatographie	23
2.4 Diversitäts-Assay	25

2.5 Biochemische- und biophysikalische Methoden.....	26
2.5.1 Mikrotiterplatten-Bindungsassay (Fluorescence dye-linked aptamerassay, FLAA).....	26
2.5.2 Magnetpartikel-ELISA	27
2.5.3 Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR).....	27
2.5.4 Nachweis der RNA-Aptamer-Bindung an Monoamin	28
3. Materialien.....	30
4. Ergebnisse	35
4.1 Erste in vitro-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 10 Runden.....	35
4.1.1 Überwachung des Diversitätsverlustes mittels Diversitäts-Assay.....	37
4.1.2 Kontrolle der Anreicherung funktioneller Sequenzen mittels FLAA	38
4.1.3 Hochdurchsatzsequenzierung aller Selektionsrunden	39
4.2 Zweite in vitro-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden.....	43
4.2.1 Kontrolle der Anreicherung funktioneller Sequenzen mittels FLAA	44
4.2.2 Hochdurchsatzsequenzierung	44
4.3 Dritte in vitro-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden	45
4.3.2 Hochdurchsatzsequenzierung	47
4.4 Charakterisierung der Streptavidin-Aptamere.....	48
4.4.1 Strukturvorhersagen selektierter Einzelklone	48
4.4.2 Qualitative Bindungsstudien selektierter Streptavidinaptamere	50
4.4.3 Oberflächenplasmonresonanz.....	52
4.5 Anwendungen von Streptavidin-Aptameren.....	54
4.5.1 Nachweis der kovalenten Immobilisierung der Streptavidin-Aptamere auf magnetischen Partikeln.....	55
4.5.2 Magnetpartikel-ELISA	55
4.5.3 Aptamerbasierte Affinitätschromatographie von Streptavidin-Fusions-Protein aus Zelllysat	56
4.6 Amplifikationsreaktionen in Emulsionen	59
4.7 RNA-SELEX gegen kleine Moleküle bzw. Monoamine.....	60
4.7.1 Nachweis der RNA-Aptamer-Bindung an Monoamin-Dimethylcasein (DMC)	61
5. Diskussion	63
5.1 In vitro-Selektionen von DNA-Aptameren	63
5.2 Diversitäts-Assay	68
5.3 Hochdurchsatzsequenzierung.....	69
5.4 Charakterisierung der Streptavidin-Aptamere.....	70
5.5 Anwendungen von Streptavidin-Aptameren.....	72
5.6 Emulsionen	73
5.7 In vitro-Selektion von RNA-Aptameren, Qβ-Replikase für die RNA-Amplifikation.....	74
5.8 Markt- und Patentsituation.....	77

5.9 Anwendungspotenziale und Ausblick	78
6. Zusammenfassung.....	80
7. Summary	81
8. Literaturverzeichnis	82
9. Anhang	89

1. Einleitung

Evolution ist die Grundlage allen Lebens und damit auch ein wichtiger Mechanismus, mit dessen Verständnis in der modernen Biologie und Biochemie neue Anwendungen entstehen können. Die älteste anerkannte Evolutionstheorie stammt von Charles Darwin (1809-1882). Auch wenn in der ersten Ausgabe seines 1859 erschienenen Werkes „*On the Origin of Species by Means of Natural Selection*“ der Begriff Evolution noch nicht auftaucht, so liefert es doch in sich schlüssige, kausale Erklärungen den Evolutionsprozess betreffend und führt die Indizien für den phylogenetischen Zusammenhang der Organismen auf. Darwin führt Evolution auf die natürliche Auslese („Kampf um das Dasein“, Selektion) und zufällige Veränderungen (Mutationen) des Erbmaterials zurück. Seine Erkenntnisse liefern noch heute die Grundlage für das Verständnis von Funktion und Fortentwicklung in der Biologie.

Die kleinste Einheit in der die Evolution stattfindet, ist innerhalb der lebenden Zelle der Träger der genetischen Information: Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA). Die wirkenden Prozesse sind Amplifikation (genetische Vervielfältigung), Mutation (genetische Variation) und Selektion (Auswahl bevorzugter Phänotypen) [49]. Dass diese chemischen Vorgänge auch außerhalb eines Organismus reproduzierbar sind, konnte Sol Spiegelman bereits ein Jahrhundert nach Darwin mit einer künstlichen Auslese unter Makromolekülen außerhalb eines biologischen Systems im Reagenzglas nachweisen. Die von Spiegelman 1967 veröffentlichte Studie „*An Extracellular Darwinian Evolution Experiment with a Self-Duplicating Nucleic Acid Molecule*“ [70] kann als Basis der *in vitro*-Evolutionsexperimente gesehen werden und stellte nur den Anfang einer intensiven und übergreifenden Forschung in den Bereichen Biologie und Chemie dar.

Im Jahr 1985 konnte sich *Phage Display* als erstes Selektionsverfahren mit dem Grundprinzip der Genotyp-Phänotyp-Kopplung etablieren [99]. Mit diesem Verfahren lassen sich Protein-Protein-Interaktionen aufklären: Aus großen, rekombinanten Gen-Bibliotheken (Phagengenom) werden Proteinteile (z.B. Antikörperfragmente) oder komplette Proteine funktionell auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert, um anschließend geeignete Bindepartner für einen bestimmten Liganden zu isolieren und zu identifizieren.

Mit der Etablierung enzymatischer Vervielfältigungsreaktionen von Nukleinsäuren *in vitro* wurden die Grundsteine für weitere molekulare Evolutionsexperimente geliefert. Auf die 1986 von Kary Mullis et al. [73] beschriebene Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction* - PCR) folgten weitere Methoden wie die reverse Transkription von RNA [23], die *in vitro*-Transkription oder auch die RNA-Synthese [69] und die isothermale Amplifikation von Nukleinsäuren.

Anfang der 1990er Jahre folgte eine neue *in vitro*-Evolutionstechnologie für die Selektion spezifisch bindender Nukleinsäuren (=Aptamere): das SELEX-Verfahren.

1.1 *In vitro*-Selektion von Nukleinsäuren (SELEX)

Die Isolation funktioneller Nukleinsäureliganden (= Aptamere, s. 1.2) aus hoch komplexen kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken mit bis zu 10^{15} Molekülen, erfolgt mittels der *in vitro*-Selektion oder auch Evolution [35]. Das hierzu verwendete SELEX-Verfahren (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) wurde erstmals von Tuerk & Gold [114] mittels an T4-DNA-Polymerase bindenden RNA-Molekülen beschrieben. Kurz darauf folgten weitere Publikationen von Ellington & Szostak [26] über spezifisch an organische Farbstoffe bindende RNA-Moleküle und von Robertson & Joyce [87] über die Anreicherung einer katalytisch aktiven Strukturvariante (Ribozym), das bevorzugt ssDNA-Substrate anstelle einzelsträngiger RNA spaltet.

Ausgehend von einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek (s. 1.4) werden in einem iterativen Prozess die spezifisch bindenden Oligonukleotide an einer Zielstruktur (= Target) angereichert, da die Komplexität der Bibliothek eine Anreicherung bindender Nukleinsäuren in einem einzigen Selektions- und Amplifikationsschritt nicht zulässt. Ursprünglich wurde dieses Verfahren für RNA-Moleküle beschrieben, abgeändert ist es jedoch auch für die Selektion von DNA-Aptameren anwendbar [35, 44]. Der Ablauf einer *in vitro*-Selektion von DNA-Aptameren ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die Separation zielmolekülbindender Polynukleotide von solchen ohne substanzielle Affinität ist in diesem Prozess von entscheidender Bedeutung. Erfolgt diese physikalische Trennung ohne Immobilisierung des Zielmoleküls, z.B. durch Ultrafiltration über eine Nitrocellulosemembran [114], [7], kann es zum Verlust targetspezifischer Oligonukleotide bzw. zu unspezifischen Anreicherungen an der Membran kommen [106].

Ein weiteres Verfahren der Aptamer-Zielmolekül-Komplexe, das ohne Immobilisierung auskommt besteht in der elektrophoretischen Trennung: Die Kapillarelektrophorese-SELEX (CE-SELEX, [65]).

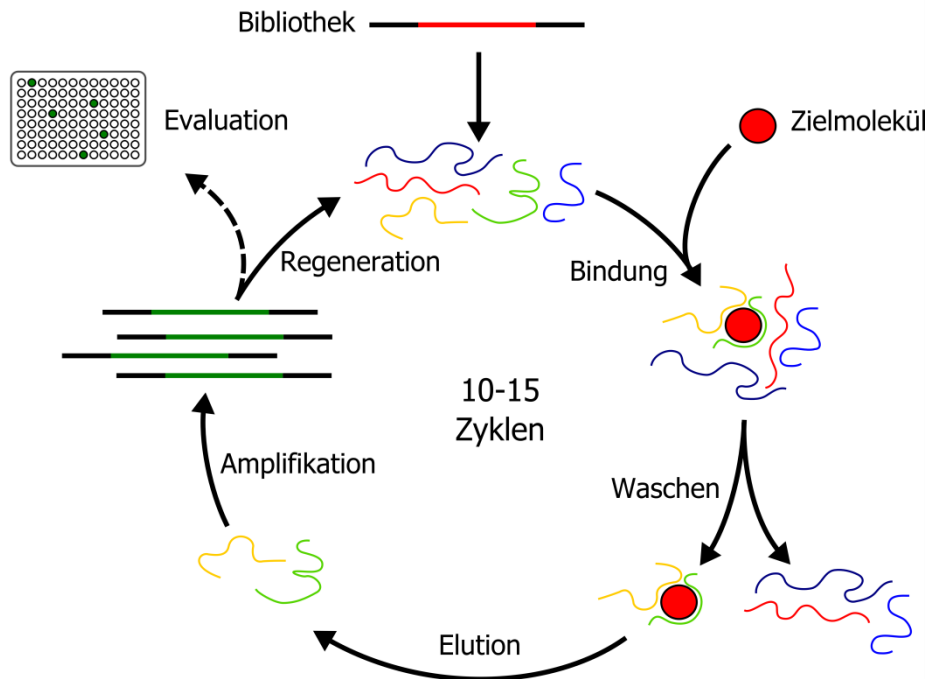


Abb. 1: SELEX-Prozess zur Gewinnung von DNA-Aptameren. Eine einzelsträngige Nukleinsäurebibliothek wird mit einem Zielmolekül inkubiert, nicht bindende Sequenzen werden durch Waschen entfernt. Nach Elution der zielmolekül-assoziierten Moleküle erfolgt deren Vervielfältigung und Regeneration. Für eine Anreicherung werden zumeist 10 bis 15 Zyklen durchlaufen, bevor durch Klonierung die Sequenzen vereinzelt und anschließend sequenziert bzw. identifiziert werden können.

Für die Immobilisierung des Targets auf Säulenmatrizes (z.B. Sepharose, Agarose) [113] werden substantielle Mengen des Zielmoleküls benötigt; die Affinitätschromatographie wird daher zunehmend durch die Verwendung magnetischer Partikel (*magnetic beads*) abgelöst [106]. Diese paramagnetischen, eisenhaltigen Partikel zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung aus: die magnetische Separationstechnologie erlaubt den Einsatz geringer Mengen des Zielmoleküls, zudem ist sie schnell, effizient und stringenter Waschschritte sind möglich [105]. Außerdem können mehrere Experimente parallel und automatisiert durchgeführt werden [33, 128]. Nicht gebundene Nukleinsäuren lassen sich durch Waschschritte aus dem Selektionszyklus entfernen. Eine Erhöhung des Waschvolumens und der Anzahl der Waschschritte, sowie eine Verringerung der Inkubationszeit führt zu einer Verstärkung der Stringenz [62].

Für die Amplifikation der an eine Zielstruktur gebundenen Nukleinsäuren müssen diese abgelöst bzw. eluiert werden. Dies geschieht meist unspezifisch durch SDS (Natriumlaurylsulfat), Harnstoff, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Imidazol oder Hitzedenaturierung, wobei sich dann auch Matrixbinder im Eluat befinden können. Eine spezifische Elution kann durch Konkurrenz oder Targetabspaltung erreicht werden.

In der Vervielfältigung der eluierten Nukleinsäuren unterscheiden sich DNA- und herkömmliche RNA-Selektionen maßgeblich. Für die Amplifikation mittels PCR ist bei RNA-Molekülen zuvor ein

Umschreiben in cDNA mittels reverser Transkriptase notwendig. Bei der anschließenden Vervielfältigung wird über einen Primer ein T7-Promotor eingefügt, damit der RNA-Pool für die nächste Selektionsrunde über die *in vitro*-Transkription generiert werden kann. Die Anreicherung target-assoziiertes DNA-Aptamers erfolgt durch eine PCR.

Bei erneuter Inkubation mit dem Zielmolekül belegen Aptamere aus der neuen Bibliothek der zweiten Selektionsrunde mit höherer Affinität die freien Bindungsplätze. Sequenzen mit niedrigerer Bindungsaffinität scheiden aus dem *in vitro*-Evolutionsprozess aus. In den aufeinanderfolgenden Zyklen von Selektion und Verstärkung setzen sich letztlich die Aptamere mit der höchsten Bindungsaffinität durch. Üblicherweise werden dafür 8-15 Zyklen benötigt. Eine zusätzliche Negativ-Selektionsrunde, d.h. die Verwendung der Selektionsmatrix ohne Zielmolekül, entfernt Matrixbinder aus der Population.

Seit der Erstbeschreibung des SELEX-Verfahrens im Jahr 1990 [114] wurden zahlreiche Variationen vorgestellt und publiziert. So gelang beispielsweise Nitsche et al. [78] mit der MonoLexTM-Methode die Selektion eines DNA-Aptamers gegen das Vaccinia-Virus in nur einer Runde mittels Affinitätschromatographie – mit physikalischer Segmentierung der Affinitätsmatrix und einem einzigen Amplifikationsschritt. Eine weitere Möglichkeit, Aptamere gegen große Moleküle wie Proteine oder Proteinkonjugate zu isolieren, ist eine CE-SELEX (*capillary electrophoresis*-SELEX), bei der Targetmolekül-Nukleinsäure-Komplexe über eine Kapillarelektrophorese von nicht bindenden Sequenzen getrennt werden [65–67, 110]. Weiterhin wurden noch die FACS-SELEX bei der die Sortierung von Zellen als Separationsstrategie eingesetzt wird [84] und die *Cell*-SELEX [22] zur Isolation zellspezifischer Aptamere beschrieben.

1.2 Aptamere

Aptamere (lat. *aptus* = passend; gr. *meros* = Partikel) sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide (DNA oder RNA) [26]. Neben ihrer Eigenschaft als Träger genetischer Information (Genotyp), besitzen Nukleinsäuren auch die Fähigkeit, teilweise sehr stabile Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstrukturen auszubilden (s. Abb. 2) [29]. Ihre dreidimensionale Struktur entsteht (Phänotyp) durch elektrostatische Wechselwirkungen, z.B. in Form von intramolekularen Watson-Crick-Basenpaarungen, Basen-Stapelungen, „Pseudo-Knoten“, sowie parallele und antiparallele Triplexe oder Guanin-Quadruplexe [31] und begünstigt eine hochaffine und spezifische Bindung an eine Vielzahl verschiedener Moleküle. Die adaptive Bindung erfolgt durch starke Wechselwirkungen mit dem Zielmolekül, wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Anziehungen oder van-der-Waals-Kräfte [39].

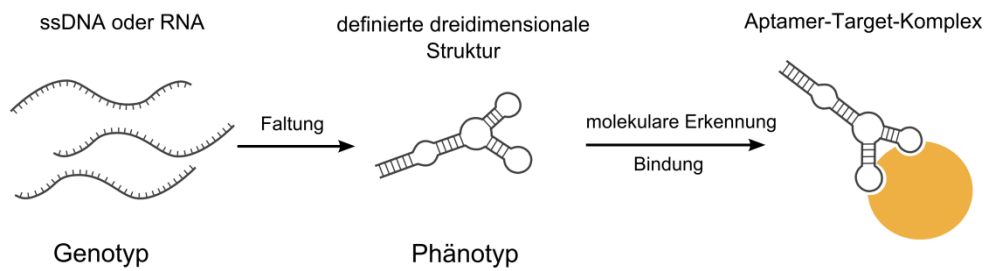


Abb. 2: Funktionsweise von Aptameren. Einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle sind durch intramolekulare Wechselwirkungen in der Lage, eine definierte, dreidimensionale Struktur auszubilden, welche spezifisch an ein Zielmolekül binden kann (nach Stoltenburg et al. [107]).

Nukleinsäuren bieten den Vorteil, dass sie Genotyp und Phänotyp in sich vereinigen. Dies bedeutet, dass sie nicht nur ihre eigene Bauanleitung in Form der genetischen Information enthalten, sondern durch ihre dreidimensionalen Strukturen auch weitere Funktionen übernehmen können. Folglich eignen sich Aptamere für ein ähnlich breites Spektrum von Anwendungen wie Antikörper, z.B. in der Diagnostik, der Therapie und in biotechnischen Verfahren wie der Affinitätschromatographie.

Das Spektrum möglicher Zielmoleküle für Aptamere ist nahezu unerschöpflich: es umfasst Proteine, Peptide, anorganische und kleine organische Moleküle, Kohlenhydrate, Antibiotika oder auch komplexe Mixturen, wie Zelllysate und ganze Zellen [107]. In Tabelle 1 sind Zielgruppen mit einigen erfolgreich selektierten Aptameren beispielhaft aufgelistet. Dies verdeutlicht die enorme Bandbreite an Zielstrukturen für Aptamere und die daraus resultierenden Anwendungsgebiete. Einen weiteren Überblick über bislang selektierte Aptamere bietet die online-Datenbank der Universität Texas [134].

Tab. 1: Beispiele für selektierte Aptamere und deren Zielmoleküle

Zielstruktur	Zielmolekül	Nukleinsäure	Dissoziationskonstante (K_d)	Quelle
kleine Moleküle	Kokain	DNA	0,4 - 10 μ M; 20 μ M	[104]
	Theophyllin	RNA	0,3 μ M	[47]
Nukleotide	ATP	DNA	12 μ M	[42]
	Flavinmononukleotid (FMN)	RNA	500 nM	[30]
Antibiotika	Tobramycin	RNA	3 μ m	[121]
	Tetracyclin	RNA	1 μ M	[6]
	Daunomycin	DNA	20 nM	[129]
Farbstoffe	Sulforhodamin B	RNA	630 nM	[28]
	Malachitgrün		1 μ M	[36]
Viren	Vaccinia-Virus	DNA		[78]
Peptide	Rev-Peptid	RNA	20 nM	[132]
Proteine	L-Selectin	DNA	66 \pm 34 pM (37°C)	[122]
	Thrombin	DNA	25 nM	[11]
	Immunglobulin E	DNA	10 – 35 nM	[123]
Zellen	<i>Trypanosoma cruzi</i>	RNA	40 - 400 nM	[116]

Das für die Selektionen dieser Forschungsarbeit gewählte Zielmolekül Streptavidin besitzt ein Molekulargewicht von 16,8 kDa und besteht aus vier identischen Untereinheiten (s. Abb. 3). Diese sind in der Lage, jeweils ein Molekül Biotin (=Vitamin B7 oder H) mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von 4×10^{-14} M [37] zu binden, was eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen ist. Es wurde Anfang der 1960er Jahre aufgrund seiner antibiotischen Wirkung bei der Fermentation von *Streptomyces avidini* entdeckt [37].

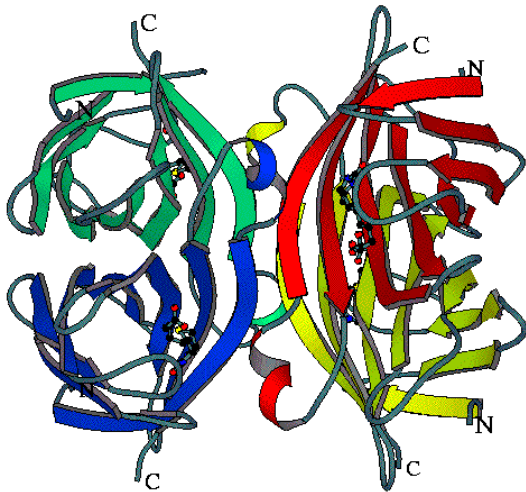


Abb. 3: 3D-Struktur eines Streptavidin-Tetramers mit Liganden. Jedes Monomer ist in der Lage ein Biotinmolekül zu binden [29].

Neben dem Polyhistidin-tag zählen die streptavidin-bindenden Sequenzen zu den am meisten verwendeten kurzen Affinitätspeptiden für die Aufreinigung und Detektion rekombinanter Proteine. Um das Streptavidin-Biotin-System auch in der Biotechnologie nutzen zu können, z.B. für die Affinitätschromatographie rekombinant exprimierter Proteine, wurden verschiedene streptavidin-bindende Affinitäts-peptide (tags) entwickelt, die kompetitiv mit Biotin eluierbar sind. Zunächst wurde 1993 das *Strep-tag*[®]-I-Peptid vorgestellt [93], welches allerdings nur C-terminal an Proteine fusioniert werden kann.

Infolge dessen wurde das sowohl N- als auch C-terminal fusionierbare *Strep-tag*[®]-II-Peptid entwickelt [94]. Es bindet an Streptavidin mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 13 - 72 \mu\text{M}$ [94]. Für die streptavidin-bindenden Peptide Nano-tag(9) und Nano-tag(15) konnten sogar Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich ermittelt werden [58].

Neben den streptavidin-bindenden Affinitätspeptiden wurde Streptavidin auch für die Bindung an das *Strep-tag*[®]-II-Peptid optimiert [118]. Die Streptavidinmutante *Strep-Tactin*[®] erlaubt eine Elution des gebundenen Fusionsproteins mithilfe des Biotinanalogs Desbiotin. Dessen reversible Bindung ermöglicht eine Wiederverwendung der Affinitätsmatrix. Das *Strep-tag*[®]-II-Peptid bindet *Strep-Tactin*[®] mit einer Dissoziationskonstante von $K_d = 1 \mu\text{M}$ [118].

1.3 Aptamere und ihre Anwendungen

Eine Selektion von Aptameren lässt sich gezielt auf spätere Applikationen ausrichten, wodurch das Anwendungsspektrum sehr weit gefächert ist.

Das erste therapeutisch eingesetzte Aptamer richtete sich gegen den humanen VEG-Faktor (*vascular endothelial growth factor*) und ist mittlerweile als Wirkstoff Macugen® zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) zugelassen. Es handelt sich dabei um ein 2'-Fluor-Pyrimidin- und 2'-O-Methyl-Purin-substituiertes 27mer RNA-Aptamer (NX1838), das als Arzneimittel unter dem Namen Pegaptanib® erhältlich ist [76]. Derzeit befinden sich weitere potenzielle Medikamente auf DNA-Basis in Phase I und II. Darunter das anti-Ghrelin-Aptamer GnRH, ein Spiegelmer (L-RNA) der Firma Noxxon [126], welches bereits erfolgreich im Tierversuch getestet wurde [100] sowie das gegen den von-Willebrand-Faktor gerichtete Aptamer [32] der Firma Archemix (Arc1779), welches sich seit 2008 in der Phase IIb für die Mikroangiopathie-Therapie befindet.

Generell gelten Aptamere aufgrund ihrer hohen Stabilität, Möglichkeit zur chemischen Modifikation und der einfachen chemischen Synthetisierbarkeit als viel versprechende molekulare Werkzeuge in der medizinischen Diagnostik und Umweltanalytik. Im Gegensatz zu antikörperbasierten Systemen sind kurze Haltbarkeit und die begrenzte Möglichkeit zur Regeneration keine limitierenden Faktoren. Aptamere werden derzeit in zahlreichen Methoden der Biosensorik angewendet. Für die Entwicklung und Erprobung von optischen, massesensitiven und potentiometrischen Sensoren [108] konnte vielfach das bereits 1992 vorgestellte Anti-Thrombin-Aptamer [11] beispielhaft eingesetzt werden.

Einige aptamerbasierte Formate haben sich bereits in der Biotechnologie etabliert: In der ELISA-analogen Anwendung des *Enzyme Linked Oligonucleotide Assay* (ELONA) [24], im *Enzyme Linked Aptamer Assay* (ELAA) [2] und im *Fluorescence dye-linked aptamer assay* (FLAA) [127]. Zudem eignen sich Aptamere auch zur Aufreinigung von Proteinen in der Affinitätschromatographie. Es können sehr milde Elutionsbedingungen gewählt werden und Aptamere können ohne oder mit nur geringem Verlust ihrer Aktivität regeneriert werden, wodurch sich aptamerbasierte Chromatographiemedien mehrfach verwenden lassen.

1.3.1 Vergleich Aptamere und Antikörper

Im Vergleich zu Antikörpern sind Aptamere deutlich kleiner (<25 kDa, AK: >150 kDa) und lassen sich rasch und kostengünstig herstellen. Für verschiedenste Anwendungen, z.B. die *in vitro*-Diagnostik [85] und die Chromatographie, gewinnen sie zunehmend an Bedeutung; u.a. weil sie eine hohe Temperaturbeständigkeit besitzen und sich sehr einfach chemische Modifikationen

einfügen lassen. Aptamere können auch unter für die Antikörperproduktion toxischen Bedingungen hergestellt werden – wie etwa bei Biosensoren für Enterotoxin aus Staphylokokken bzw. Cholera toxin [13]. Zudem lassen sie sich bereits während der Selektion gezielt an physikochemische Bedingungen späterer Applikationen anpassen.

Selektierte, chemisch synthetisierte Aptamere enthalten keine toxischen oder immunogenen Substanzen und besitzen keine Variationen zwischen einzelnen Chargen, was sie für therapeutische Anwendungen besonders attraktiv macht. Im Vergleich mit Antikörpern erfordert die SELEX-Technologie zudem weder Tierversuche noch Zellkulturen, womit Aptamere nicht nur kostengünstiger sind, sondern auch ethische Vorteile bieten.

1.3.2 Nukleinsäuremodifikationen

Für viele Anwendungen im medizinischen und diagnostischen Bereich sind Nukleinsäuren nur bedingt geeignet, da es ihnen an der nötigen *in vivo* Stabilität mangelt. In biologischen Flüssigkeiten (z.B. Serum oder Zelllysate) enthaltene Nukleasen können Aptamere in kürzester Zeit abbauen [57]. Modifikationen am 2'-C-Atom der Pyrimidinbasen, wie das Einfügen einer Aminogruppe, einer O-Methylgruppe oder eines Fluoratoms, erhöhen die Resistenz gegenüber Nukleasen [35, 89] ebenso wie die Verwendung von 4'-Thiopyrimidinen [53] oder Phosphorothioat-Oligonukleotiden [102]. Dabei wird ein Sauerstoffatom im Phosphat durch ein Schwefelatom entweder teilweise (am 3' und 5' Ende) oder vollständig ersetzt (s. Abb. 4).

Diese chemischen Veränderungen am Nukleinsäurerückgrat steigern die funktionelle Halbwertszeit von Aptameren *in vivo* erheblich, jedoch ist die Synthese weniger effizient und kostenintensiver im Vergleich zu einfachen DNA-Oligonukleotiden [14]. Zudem treten modifizierte Nukleotide in der Natur nicht auf; *in vivo* können toxische Metabolite entstehen [14].

Eine weitere post-SELEX-Modifikation zur Stabilitätsteigerung besteht in der Verwendung von *Locked nucleic acids* (LNA) [83]. Bei dieser Form artifizierender Oligonukleotide sind das 2'-C- und das 4'-C-Atom der Ribose über eine Sauerstoff-Methylen-Brücke miteinander verbunden und dadurch in der 3'-*endo*-Konformation fixiert. Bei therapeutisch eingesetzten Aptameren verzögert eine Polyethylenglykol-Kappe (PEG, ca. 40 kDa) am 5'-Ende die renale Ausscheidung [76].

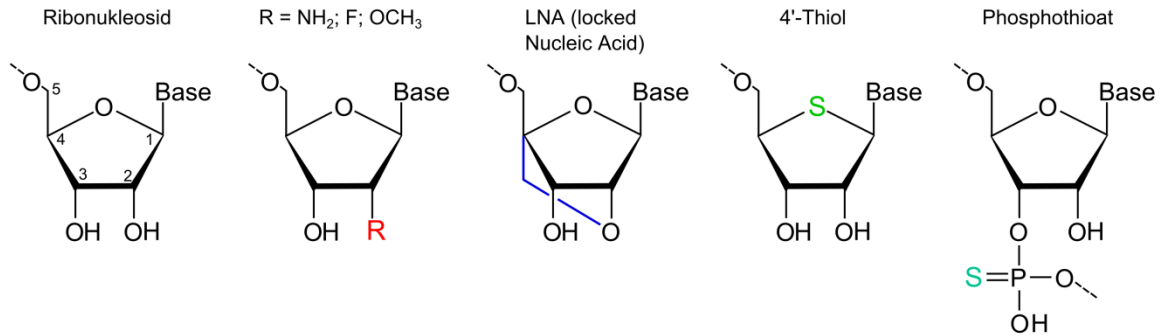


Abb. 4: Möglichkeiten der Modifizierung von Ribonucleosiden zur Stabilitätssteigerung. Nucleosid 2: Ersetzen der Hydroxylgruppe am 2'-C-Atom der Ribose durch eine Amino-, O-Methylgruppe oder ein Fluoratom; Nucleosid 3: Einfügen einer Methylenebrücke zum 4'-C-Atom; Nucleosid 4: Transition des Sauerstoffs durch Schwefel innerhalb des Pentoseringes; Nucleosid 5: Einführen von Phosphothioaten am Rückgrat.

Eine weitere Möglichkeit, den Abbau durch natürlich vorkommende Enzyme zu verhindern, bietet die Verwendung von Spiegelmeren (= L-Nucleinsäuren) [27], wie sie in Abbildung 5 dargestellt sind. Diese werden durch Spiegelung (Verwendung von L- anstelle von D-Nucleotiden) eines an einem D-Peptid (Enantiomer des eigentlichen Zielmoleküls) selektierten Aptamers generiert [55, 79].

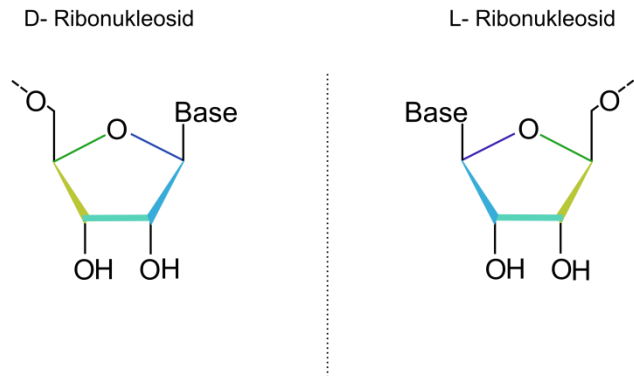


Abb. 5: Nucleoside aus Ribose-Enantiomeren (D- und L-Form).

1.4 Nucleinsäure-Bibliotheken und Diversitäten

Für SELEX-Experimente verwendete Nucleinsäure-Bibliotheken werden durch automatisierte Festphasensynthese hergestellt und umfassen im Allgemeinen einen randomisierten Bereich von 20 bis 80 Nucleotiden (s. Abb. 6). Dieser wird von konstanten Primerregionen, die für die Amplifikation notwendig sind, flankiert.

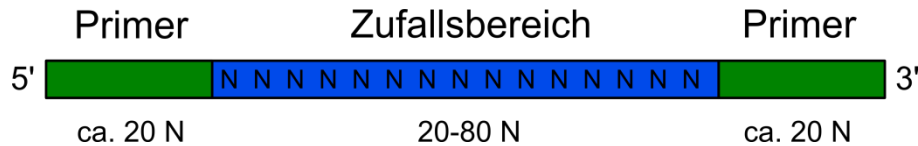


Abb. 6: Schematische Darstellung einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek. Für die Selektion von DNA-Aptameren eingesetzte Bibliotheken bestehen aus einer 20-80 Nukleotide umfassenden randomisierten Region, die am 5'- und am 3'-Ende von konstanten Primersequenzen flankiert wird.

Die theoretische Komplexität der synthetischen Bibliothek ergibt sich aus der Anzahl der variablen Positionen zur Basis der möglichen Nukleinbasen. Bei einem 40 Basen umfassenden randomisierten Bereich bedeutet dies 4^{40} ($1,2 \times 10^{24}$) Kombinationen. Jedoch sind nur 10^{12} - 10^{15} auch wirklich experimentell erreichbar [44]. Verglichen mit anderen kombinatorischen Bibliotheken, z.B. *Phage Display* mit bis zu 10^{10} auf Phagen präsentierten Peptiden [98] oder mit dem Immunrepertoire eines Säugetiers (ca. 10^8 Immunglobuline), bedient sich SELEX einer Startbibliothek mannigfacher Vielfalt, so dass die Anwesenheit von Liganden gegen praktisch jede beliebige Zielstruktur angenommen werden kann.

Um über die photometrische Bestimmung der Größe eines Genoms hinaus Informationen über dessen Komplexität, d.h. die Anzahl unterschiedlicher Sequenzen, zu erhalten, haben Britten & Kohne [12] vor der Einführung der Sequenzierung Schmelzpunktanalysen mit anschließender Rehybridisierung durchgeführt. Der daraus zu bestimmende $C_0t_{1/2}$ -Wert (C_0 = Ausgangskonzentration der DNA-Sequenz, t = Reaktionszeit) jeder DNA ist bei gleicher Moleküllänge und Renaturierungstemperatur linear proportional zur kinetischen Komplexität [12, 15]. Ein doppelt so hoher Wert bedeutet eine doppelt so hohe Sequenzheterogenität.

Eine Adaption dieses Assays an moderne *real-time*-PCR-Geräte ist die von Baum & McCune [4] vorgestellte AmpliC_0t -Methode. Der Anteil doppelsträngiger DNA aus zuvor amplifizierten Pools wird vor und nach Denaturierung und Rehybridisierung (s. Abb. 7) mittels des dsDNA-bindenden Farbstoffes SYBR-Green gemessen.

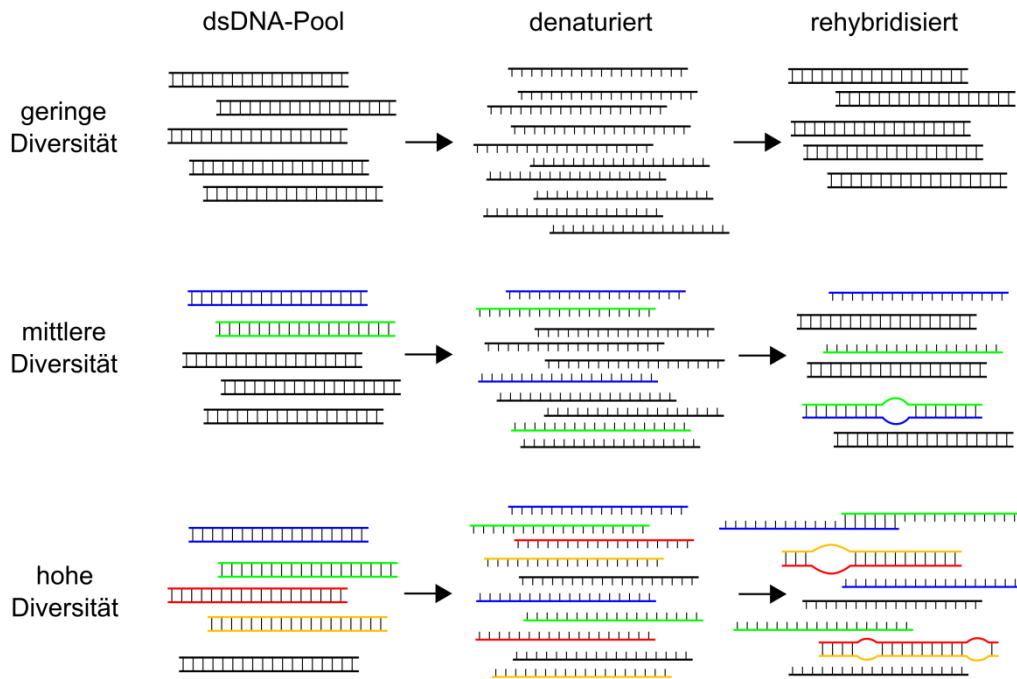


Abb. 7: Schematische Darstellung der Kinetiken von dsDNA-Poolen unterschiedlicher Diversität. Mit steigender Diversität reassoziieren komplementäre DNA-Stränge nach Denaturierung schlechter bzw. langsamer; durch unvollständige Rehybridisierung kann es zur Ausbildung von Heteroduplexen kommen.

1.5 Wasser-in-Öl-Emulsionen

Die für den SELEX-Prozess notwendige Vervielfältigung der komplexen Nukleinsäurepools stellt eine Herausforderung dar. Im Vergleich zu monoklonalen Proben finden bei hoch diversen Nukleinsäuregemischen denaturierte Einzelstränge in einem anschließenden Rehybridisierungsschritt (Annealing) nicht – oder erst nach langer Zeit – ihren komplementären Strang. Kommt es zu einer unvollständigen Rehybridisierung, können Heteroduplexe entstehen (s. Abb. 7).

Auch weitere PCR-Artefakte wie die Entstehung chimärer Sequenzen durch Rekombination homologer Bereiche oder die Überamplifikation schnell replizierender Sequenzen sind bei den Vervielfältigungsreaktionen im SELEX-Prozess möglich [125]. Durch eine *in vitro*-Kompartimentierung mittels Wasser-in-Öl-Emulsionen entstehen separierte Reaktionsräume (Mizellen) [92, 111], welche als äquivalent zum Reaktionsgefäß betrachtet werden können. Die Amplifikationsreaktionen können in den Mizellen getrennt voneinander und somit unter gleichen, kontrollierten Bedingungen ablaufen (s. Abb. 8).

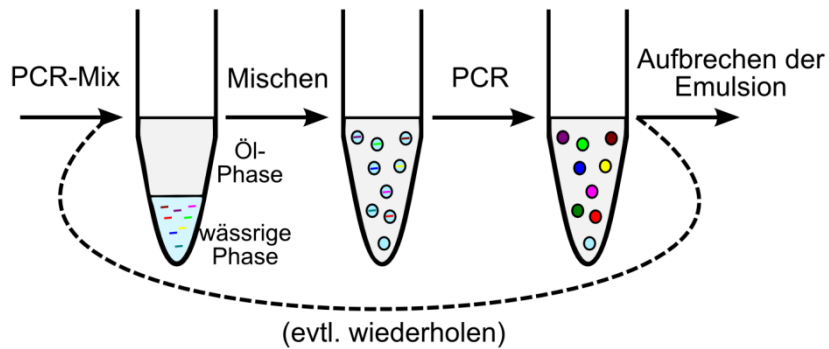


Abb. 8: Schematische Darstellung einer Amplifikationsreaktion in Emulsionen.

1.6 Hochdurchsatzsequenzierungen der nächsten Generation – *next-generation sequencing* (NGS)

Seit der Einführung der Sanger-Sequenzierung in den 1970er Jahren [91] ist die DNA-Sequenzierungstechnologie weit fortgeschritten. Der Wettbewerb, die DNA-Sequenzierung effizienter zu gestalten, begann 1990 mit dem Start des Humangenomprojekts (*Human Genome Project*, HGP) [43]. Jedes der *next-generation sequencing*-Verfahren, die nach Abschluss des Projektes im Jahr 2003 [43] zur Marktreife gelangten, nahm für sich in Anspruch, rascher, präziser und kostengünstiger zu sequenzieren. Heutige Technologien (s. Tab. 2) gestatten durch eine hohe Miniaturisierung und Parallelisierung der Sequenzierungsschritte eine immense Durchsatzsteigerung und -leistung zu einem Bruchteil der ursprünglichen Kosten.

Tab. 2: Spezifikationen und Anwendungen der führenden *next-generation sequencing*-Technologien im Vergleich (Stand 2010).

	454/FLX (ROCHE)	Genome Analyser (ILLUMINA/SOLEXA)	SOLID™ (LIFE TECHNOLOGIES)
Jahr der Markteinführung	2005	2006	2007
Sequenzierungsmethode	Pyrosequenzierung	Sequenzierung durch Synthese/ Hybridisierung	Sequenzierung durch Ligation
Amplifikation	Emulsions-PCR	Brückenamplifikation	Emulsions-PCR
Sequenzdaten/Lauf	1 bis 1,5 Mio.	bis zu 270 Mio.	bis zu 320 Mio.
Datenmenge/Lauf	400-500 Mb	bis zu 50 Gb	60 Gb
Leselänge	ca. 400 bp	75-100 bp	50 bp
Laufzeit	ca. 10 Std	9 Tage	10 Tage

1.7 Zielstellung

Derzeit bestehende Protokolle für die Selektion hochaffiner Binder erfordern ca. 10-15 Zyklen, bei der anschließenden Vereinzelung durch Klonierung werden relevante Sequenzen z.T. nicht erfasst. Die Reduktion des Prozesses auf wenige, parallel und automatisiert durchführbare Selektionsrunden und die Auswertung mittels Hochdurchsatzsequenzierung könnte demnach eine massive Zeitersparnis erbringen und dabei helfen, PCR-Artefakte aus häufig durchgeführten Amplifikationsschritten zu vermeiden.

Eine beispielhaft in 10 Runden durchgeführte Selektion von DNA-Aptameren gegen das Zielmolekül Streptavidin mit anschließender Klonierung und Sanger-Sequenzierung, soll durch eine weitere Sequenzierung im Hochdurchsatz einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung der evolutiven Vorgänge während der Selektion leisten und zudem die Identifizierung weiterer bindender Nukleinsäuren ermöglichen.

Weitere SELEX-Experimente können anschließend entsprechend optimiert durchgeführt und die Zeitersparnis durch den Einsatz von Sequenzieretechnologien der nächsten Generation (*next-generation sequencing*) gezeigt werden.

Generierte Aptamere sollen ergänzend charakterisiert und beispielhaft für eine mögliche biotechnologische Anwendung – die Affinitätschromatographie – getestet werden.

Eine Selektion von RNA-Aptameren nach herkömmlichen Protokollen erfordert für jede Runde der Amplifikation eine reverse Transkription der eluierten Nukleinsäuren sowie nach der Amplifikation mittels PCR eine *in vitro*-Transkription für die RNA-Synthese. Um diesen zeitaufwendigen und ergebnisverzerrenden Prozess zu umgehen bzw. zu vereinfachen, soll eine RNA-Polymerase für die Vervielfältigung der RNA-Moleküle in einem SELEX-Prozess mit wenigen Selektionsrunden getestet werden. Für die Identifizierung angereicherter Sequenzen (d.h. potenzieller Binder) soll auch in diesem Experiment die Hochdurchsatzsequenzierung genutzt werden.

2. Methoden

2.1 Systematische Evolution von Liganden durch Exponentielle Anreicherung (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, SELEX)

Die Selektionen der Streptavidin-Aptamere erfolgten halbautomatisiert mit dem Magnetpartikelprozessor KingFischer Flex (THERMO SCIENTIFIC). Das Zielmolekül befand sich für die ersten drei Selektionen auf streptavidinderivatisierten, magnetischen Partikeln (Dynabeads[®] M-280, Streptavidin, 10 mg/ml, INVITROGEN[™]) sowie für die Selektion von RNA-Aptameren auf carboxylierten Magnetpartikeln (Carboxyl-SiMAG; CHEMICELL), auf dessen Oberfläche kleine Moleküle kovalent immobilisiert waren (s. 2.2.9). Zur Erhöhung der Stringenz wurden die Magnetpartikel in den Runden schrittweise weniger eingesetzt und Volumen sowie Anzahl der Waschschrte erhöht. Eine Anreicherung gebundener Sequenzen für die Selektion von DNA-Aptameren erfolgte mittels PCR (s. 2.2.1), für RNA-Aptamere durch die Q β -Replikase (s. 2.2.5). Die Parameter der Selektionsrunden sind tabellarisch in den Ergebnisteilen der jeweiligen Selektion (s. 4.1, 4.2 und 4.3) aufgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion [73] wurde zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Molekülen und zur Herstellung von dsDNA- aus ssDNA-Molekülen verwendet. Die Technik beruht auf der Vervielfältigung von Matrizen-DNA durch die thermostabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* [90] durch Denaturierungs-, Renaturierungs-, und Primerelongationszyklen. Die Reaktionen erfolgten größtenteils in einem Gesamtvolumen von 50 μ l (s. Tab. 3), die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 8 und 15 (s. Tab. 4)

Tab. 3: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
10 \times Puffer B (enthält 15 mM MgCl ₂ , EURx)	5	1 \times
dNTP-Mix (2,5 mM)	4	200 μ M
3'-Primer (100 μ M)	1	2 μ M
5'-Primer (100 μ M)	1	2 μ M
Matrizen-DNA	0,5-2	
Taq-Polymerase (5 U/ μ l, EURx)	0,5	2,5 U
dH ₂ O	add 50 μ l	

Tab. 4: Verwendetes PCR-Programm

Erstdenaturierung	95°C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	1 min	X Zyklen
Primeranlagerung	65°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Komplettierung	72°C	5 min	

2.2.2 Emulsions-PCR

Bei dieser Form der DNA-Amplifikation fanden die PCR getrennt in kleinvolumigen Mikrotröpfchen (Mizellen) statt: Die wässrigen Kompartimente wurden durch Emulgation eines Wasser-in-Öl-Gemischs gebildet. Zu einem 50 μ l PCR-Ansatz (s. Tab. 3) wurden 2,5 μ l bovines Serumalbumin (BSA, 10 mg/ml, NEB) zur Stabilisierung der Taq-Polymerase und 300 μ l Öl-Überstand (7% Abil WE09, 20% Mineralöl, 73% Tegosoft DEL) gegeben. Das Emulgieren erfolgte durch fünfminütiges Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis gelagert bei 4°C.

Nach der PCR wurde die Emulsion durch Zugabe von 1 ml Isobutanol aufgebrochen. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die wässrige Phase mit der DNA von der organischen Phase durch die Zugabe von Bindungspuffer (GeneMATRIX PCR/DNA clean-up Purification Kit; ROBOKLON/ EURx) und Zentrifugation für fünf Minuten separiert (s. Abb. 9).

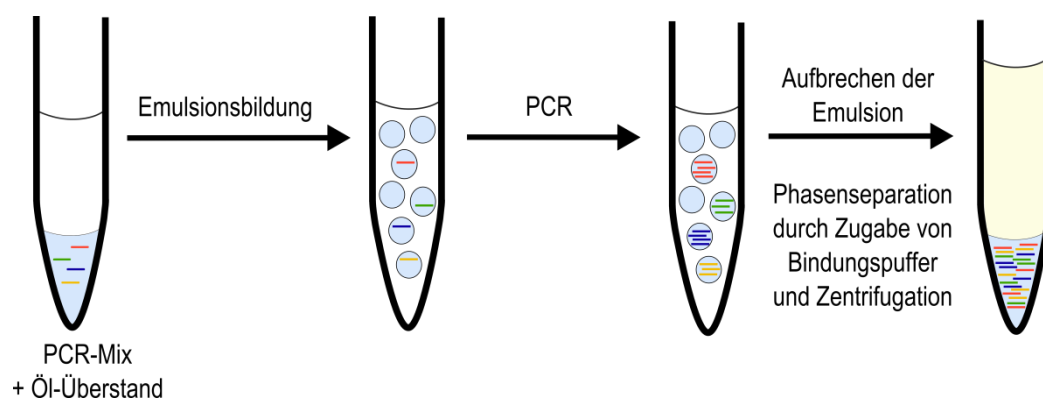


Abb. 9: Arbeitsschritte einer Emulsions-PCR. Ein PCR-Ansatz wird mit einem Ölgemisch überschichtet und zur Mizellenbildung gevortext. Nach der Amplifikation (PCR) werden die Mizellen durch Isobutanol aufgebrochen und anschließend die wässrige von der organischen Phase getrennt. Dies erfolgt durch Zugabe des *PCR-clean-up-Kit*-Bindungspuffers und einem Zentrifugationsschritt.

2.2.3 In vitro-Transkription (RNA-Synthese)

RNA-Polymerasen transkribieren DNA-Matrizen in ihre komplementären RNA-Sequenzen. Die Transkription beginnt an einer spezifischen doppelsträngigen Promotersequenz, welche von der RNA-Polymerase erkannt wird. Vorzugsweise werden Bakteriophagensysteme genutzt [69].

Die aus dem Bakteriophagen T7 stammende DNA-abhängige RNA-Polymerase erkennt eine spezifische Sequenz: Den T7-Promotor. Für die *in vitro*-Transkription wurde das T7-Transkriptionskit der Firma ROBOKLON/ EURX nach Herstellerangaben verwendet. Die doppelsträngige Matrizen-DNA stammte aus einer vorangegangenen PCR, in der Primer mit T7-Promotoren verwendet wurden.

Tab. 5: Zusammensetzung eines *in vitro*-Transkriptionsansatzes

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
T7 RNA Polymerase 5 \times Reaktionspuffer (EURX)	10	1 \times
NTP-Mix (je 2,5 mM)	3,6	1,8 mM
DTT (10 mM)	1,25	2,5 mM
Thermostabile Pyrophosphatase (20 U/ μ l, EURX)	0,25	5 U
Matrizen-DNA		1-2 μ g
T7-Polymerase (25 U/ μ l EURX)	1	25 U
dH ₂ O	add 50 μ l	

Der T7-Transkriptionsansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Verdau verbliebener Matrizen-DNA durch DNase (1 U/1 μ g DNA; RQ1 von PROMEGA, für 15 min bei 37°C). Die Aufreinigung erfolgte mit magnetischen Partikeln (s. 2.1.7).

2.2.4 Reverse Transkription

Für beide Schritte der reversen Transkription (RT), Umschreiben der cDNA in RNA und Amplifikation der DNA, wurde eine Taq-Polymerase verwendet. Tabelle 6 und 7 führen die Zusammensetzungen der Reaktionen auf.

Tab. 6: Zusammensetzung eines RT-PCR-Ansatzes, Reaktion 1

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Tris HCl (1 M, pH 8,8)	1,34	67 mM
MnCl ₂ (0,1 M)	0,4	2 mM
dNTP Mix (2,5 mM)	2	250 μ M
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,5 M)	0,66	16,5 mM
Tween-20 (1%)	0,2	0,01%
QR3-Primer (100 μ M)	0,2	1 μ M
Matrizen-DNA	14,2	
Taq-Polymerase (5 U/ μ l, EURX)	1	5 U
dH ₂ O	add 20 μ l	

Zunächst erfolgte eine Inkubation für 3 min bei 54°C, sodann für 10 min bei 72°C. Nachfolgend wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien für die Amplifikationsreaktion hinzugegeben

und nach Zugabe des Ölüberstands emulgiert (s. 2.1.2). 5 µl des Reaktionsansatzes wurden parallel ohne Emulsionen inkubiert, um den Erfolg der Amplifikation im Agarosegel überprüfen zu können.

Tab. 7: Zusammensetzung eines RT-PCR-Ansatzes, Reaktion 2

	Volumen [µl]	Endkonzentration
EGTA (5 mM)	15	750 µM
10× PCR-Puffer A (EURx)	10	1×
dNTP Mix (2,5 mM)	8	200 µM
MgCl ₂ (25 mM)	8	2 mM
QR3-Primer (100 µM)	0,8	0,8 mM
QF5-Primer (100 µM)	1	1 mM
dH ₂ O	add 100 µl	

Tab. 8: Verwendetes RT-PCR-Programm für Reaktion 2

Erstdenaturierung	95°C	30 s	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	2 min	20 Zyklen
Primeranlagerung	54°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Kompletierung	72°C	5 min	

Nach Beendigung der Amplifikationsreaktion wurden dem emulgierten Reaktionsansatz 1 ml Isobutanol zum Auflösen der Mizellen zugesetzt. Abschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNA mit magnetischen Partikeln (2.1.7).

2.2.5 RNA-Replikation mit Q β -Replikase

Die RNA-abhängige RNA-Replikase des *E. coli*-Phagen Q β repliziert einzelsträngige RNA exponentiell: So bindet das Enzym zunächst an das 3'-Ende der einzelsträngigen RNA-Matrize (plus-Strang) und synthetisiert anschließend den komplementären ssRNA-Strang (minus-Strang), welcher erneut als Matrize dienen kann [8]. Das Enzym benötigt keine Primersequenzen (*de novo*-Initiation) [17] und die Geschwindigkeit mit der Q β Phagen ihr Genom amplifizieren gehört zu den höchsten unter den Polymerasen. Die 4,2 kB lange ssRNA wird innerhalb einer Stunde um das 10⁴-fache amplifiziert [51].

Eine Vervielfältigung von RNA durch Q β -Replikase wurde bei der RNA-Aptamer-Selektion (SELEX) gegen kleine Moleküle eingesetzt – verwendete Reagenzien sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Amplifikationsreaktion fand in den Mizellen einer Emulsion statt: 300 µl Ölüberstand wurden zum Reaktionsansatz gegeben und anschließend emulgiert (s. 2.1.2). Für eine gelbasierte Kontrolle der Amplifikation wurden 2 µl des Reaktionsmix ohne Emulsion, unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei 25°C inkubiert und anschließend die Mikrokompartimente der Emulsion durch Zugabe von 1 ml Isobutanol aufgelöst. Die enthaltene RNA konnte mithilfe des GeneMATRIX Universal RNA/miRNA Purification Kits nach Herstellerangaben (ROBOKLON/EURX) aufgereinigt werden.

Tab. 9: Zusammensetzung eines RNA-Replikations-Ansatzes

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
NEB4-Puffer (10x, NEW ENGLAND BIOLABS [®])	5	1x
NTP-Mix (2,5 mM)	5	2,5 mM
Matrizen-RNA	X	
Q β -Replikase (1 U/ μ l, EPICENTRE [®])	1	1 U
dH ₂ O	add 50 μ l	

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Größen-Auftrennung von DNA-Molekülen beruht auf der negativen Ladung der Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats, die im elektrischen Gleichspannungsfeld zur Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dabei proportional zur Größe, die anhand eines Längenstandards abgeschätzt werden kann.

Es wurden in der Regel 3%ige TBE-Gele (Auftrennungsbereich < 200 bp) verwendet, welche mit 0,004% (v/v) Ethidiumbromid versetzt waren. Durch Interkalation werden somit DNA-Banden zur Auswertung im UV-Licht (bei 366 nm) sichtbar. Vor Gelauftrag wurden die Proben mit 10x Ladepuffer versetzt und als Größenstandard der O'Range Ruler™ 20 bp (FERMENTAS) verwendet.

2.2.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

PCR-Produkte und andere DNA-Proben wurden entweder mithilfe des säulenbasierten GeneMATRIX PCR/DNA Purification Kit (ROBOKLON/EURX) oder durch magnetische Partikel (magnetic beads) der Firma LGC GENOMICS (sbeadex[®]) nach Herstellerangaben aufbereitet, d.h. störende Komponenten wie Enzyme, Pufferrückstände und Primer entfernt.

Für eine magnetpartikelbasierte Aufreinigung wurden 50 μ l eines Reaktionsansatzes mit 20 μ l Partikelsuspension und 80 μ l Bindungspuffer (AP, LGC) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Rotator inkubiert. Durch das Anlegen eines starken Magneten konnten die Partikel mit der gebundenen DNA zurückgehalten und der Überstand entfernt werden. Die magnetischen Partikel wurden mit 200 μ l Waschpuffer (BN2, LGC) 5 min rotierend gewaschen, der Überstand wurde erneut abgenommen. Dieser Waschschrift wurde mit 200 μ l MilliQ-Wasser wiederholt. Abschließend wurden 30 μ l Elutionspuffer (BLM, LGC) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Nun lag die eluierte DNA in Lösung vor; der Überstand konnte in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die Magnetpartikel verworfen werden.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurebasen besitzen ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich, bei 260 nm; für photometrische Konzentrationsbestimmungen gelten daher folgende Gleichungen:

dsDNA	1 OD ₂₆₀ = 50 µg/ml
ssDNA	1 OD ₂₆₀ = 33 µg/ml
RNA	1 OD ₂₆₀ = 40 µg/ml

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich aus dem Verhältnis von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmen: Proteine absorbieren UV-Licht stärker (280 nm) als Nukleinsäuren; ein Quotient < 1,8 deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

Alle Messungen erfolgten in einem Volumen von 1,5 µl am NanoDrop[®] ND-1000 (PEQLAB).

2.2.9 Kovalente Kopplung von Nukleinsäuren an magnetische Partikel

Für die kovalente Kopplung von Aptameren oder anderen Oligonukleotiden wurden magnetische Partikel mit carboxylierter Oberfläche (Carboxyl-SiMAG, 1,0 µm; CHEMICELL) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Hierzu wurden 200 µl Magnetpartikelsuspension mit 1 ml MES (0,1 M, pH 5) zweimal für je 5 min gewaschen und anschließend in 250 µl MES (0,2 M) + 10 mg EDC resuspendiert. Nach 10 min bei RT wurden 50 µg DNA (5'-aminomodifiziert) gelöst, in 250 µl MilliQ bzw. 250 µl einer 20 mM Lösung kleiner Moleküle (Dopamin, Serotonin, Histamin und Norepinephrin) zugegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 1 ml PBS-T + Ethanolamin (10 mM) wurden die Partikel in 200 µl dieses Puffers überführt und bei 4°C gelagert.

2.2.10 Klonierung

Angereicherte Sequenzen aus der 10. Selektionsrunde der ersten Streptavidin-Selektion (s. 4.1) wurden in einen geeigneten Vektor ligiert, um sie anschließend zu vereinzeln, sequenzieren und analysieren zu können.

Durch Taq-Polymerase generierte PCR-Produkte (s. Tab. 10) weisen durch die matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität einen 3'-Überhang eines einzelnen Desoxyadenylats auf [41]. Dieser Umstand konnte für die TOPO[®]-TA-Klonierung in den Vektor TOPO[®] Vektor (INVITROGEN[™]) mit Thymidin-Überhängen genutzt werden. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 6 µl für 30 min bei RT.

Tab. 10: Verwendetes PCR-Programm

Erstdenaturierung	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	10 Zyklen
Primeranlagerung	55°C	
Elongation	72°C	1 min
Kompletierung	72°C	30 min

2.2.11 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

E. coli-Zellen des Stammes DH5 α wurden aus einer 1 ml-Übernachtskultur (LB-Medium) in 100 ml 2YT-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,7 (bei 600 nm) schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte, bzw. Trübung wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert und anschließend in 2 ml TSS-Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 200 μ l Glycerin (87%) erfolgte eine Aliquotierung und Lagerung bei -80°C.

2.2.12 Herstellung elektrokompetenter Zellen

50 ml 2YT-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3) aus einem Glycerinstock angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde am folgenden Tag mit 500 ml eines vortemperierten 2YT-Mediums bis zu einer optischen Dichte von 0,25 - 0,5 (bei 600 nm) inokuliert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 30 min auf Eis gekühlt, anschließend bei 4000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert und in 250 ml gekühltem Wasser aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4000 rpm, 4°C, 15 min) wurden die Zellen wieder in 100 ml gekühltem Wasser aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut pelletiert wurden. Das Pellet wurde in 25 ml gekühltem Glycerin (10%) gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Die erneut zentrifugierten Zellen wurden danach in 2 ml Glycerin (10%) resuspendiert und für die Lagerung bei -80°C aliquotiert.

2.2.13 Hitzeschock-Transformation

Die Transformation chemisch-kompetenter Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock, welcher die Durchlässigkeit der Bakterienzellenwände für DNA steigert. Dazu wurden jeweils 30 μ l der kompetenten Zellen (DH5 α) mit 6 μ l Klonierungsansatz oder 1 μ l Plasmid-DNA (pUC18) für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler.

Eine erfolgreiche Transformation kann durch Wachstum der Bakterien auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin) nach 24 h bei 37°C nachgewiesen werden.

2.2.14 Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli* Zellen (BL21(DE3), 30-50 µl) wurden für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend in einer geeigneten Küvette (Gene Pulser®/E.coli Pulser™ Cuvette, 0,1 cm, BIORAD) kurzzeitig einer elektrischen Spannung (1,8 kV) ausgesetzt; die Zellmembran wird vorübergehend für größere Moleküle (z.B. Plasmid-DNA) permeabel.

Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium folgte eine einstündige Inkubation, schüttelnd bei 37°C, bevor die transformierten Zellen in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin, 50 µg/µl) überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.15 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präp)

Plasmid-DNA wurde aus transformierten *E. coli*-Zellen isoliert, die in einer 2 ml-Kultur (LB-Medium) über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Es wurde nach den Herstellerangaben des Kits Plasmid dna -OLS® verfahren.

2.2.16 Sequenzierungsmethoden

Die Sequenzierung klonierter Plasmide erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. [91] und wurde in der Serviceabteilung des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt. Dies erfolgte mit 10 µl der präparierten Plasmid-DNA (s. 2.2.15) unter Angabe des verwendeten Vektors (für die passenden Primersequenzen, M13).

Für die Identifizierung von Aptameren gegen das Zielmolekül Streptavidin wurden alle Selektionsrunden mithilfe der Hochdurchsatz-Sequenzierung (*next-generation sequencing*) analysiert. Es wurde die Brückenamplifikationsgestützte Solexa-Technologie von ILLUMINA in der Serviceabteilung des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik (Berlin) verwendet.

An die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden zuvor mit einer PCR über die Primer Adapter und Barcodes angefügt (s. Tab. 13). Die gereinigten und mit unterschiedlichen Barcodes versehenen PCR-Produkte wurden im äquimolaren Verhältnis (je 500 ng) gemischt und für die Sequenzierung eingesetzt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Die Expression des Proteins MBP-SA erfolgte nach Transformation in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3)/pLysS. Dieser spezielle Expressionsstamm ist defizient in zwei Proteasen, was zu einer erhöhten Stabilität führt. Außerdem steht in diesem Bakteriengenom das Gen der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, d.h. eine Induktion der T7-Polymerase-Expression durch das Galaktose-Derivat IPTG (Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranose) wird ermöglicht.

Hierzu wurden 50 ml LB/AMP (50 μ g/ml) mit transformierten *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden weitere 100 ml LB/Amp angeimpft (OD = 0,1) und bei 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,8 wurde die Überexpression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und nach weiteren drei Stunden die Zellen pelletiert (15 min, 4000 rpm, 4°C).

Für die Lyse der pelletierten Zellen aus 50 ml Kultur wurden in 3 ml Lysepuffer aufgenommen und durch dreimalige 20 s mit Ultraschallbehandlung (Stufe 3) für jeweils 20 s aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 12000x g, RT) entfernt und der proteinhaltige Überstand für weitere Experimente abgenommen.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Gelmatrix für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Polymerisationsstarter diente Ammoniumperoxodisulfat (APS), als Radikalstabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED).

Die Auftrennung von Zelllysaten und Affinitätschromatographie-Fractionen erfolgte in 15%igen Gelen. Der BenchMark™ Protein ladder (INVITROGEN™) diente als Größenstandard.

Tab. 11: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

15%iges PAA-Trenngel	1,1 ml	A. dest.
	2,0 ml	Acrylamid (30%)
	1,3 ml	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)
	50 μ l	SDS (10%)
	50 μ l	APS (10%)
	2 μ l	TEMED
5%iges PAA-Sammelgel	1,4 ml	A. dest.
	330 μ l	Acrylamid (30%)
	250 μ l	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)
	20 μ l	SDS (10%)
	20 μ l	APS (10%)
	2 μ l	TEMED

2.3.3 Coomassieblaufärbung von Polyacrylamidgelen

Zur Visualisierung aller aufgetrennten Proteine wurde das Polyacrylamid-Gel für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung (s. 3.6) auf einem Schüttler gefärbt. Überschüssiger Farbstoff ließ sich durch mehrfaches Wechseln der Entfärbelösung (s. 3.6) aus dem Gel beseitigen.

2.3.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin et al. [44]. Das senkrecht zur Membran angelegte elektrische Feld löst die Proteine von der Trägermatrix und überführt sie auf eine Nitrocellulosemembran (HybondTM-ECLTM, AMERSHAM BIOSCIENCES). Die Durchführung erfolgte bei 80 mA für 90 min mit der „Trans-Blot, Semi-dry Transfer Cell“-Apparatur (BIORAD). Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen durch eine einstündige Inkubation der Membran in PBS-T-Puffer mit 3% BSA, abgesättigt. Vor der 30-minütigen Inkubation mit Biotin-HRP (1:4000 in PBS-T+0,1% BSA, PIERCE[®], ImmunoPure Biotinylated Horseradish Peroxidase, 1 mg/ml) bei RT wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen. Durch zweimaliges Waschen mit PBS-T wurde ungebundenes Biotin-HRP entfernt, dann 1 ml des Substrats CN/DAB (1×) dazugegeben. Nach ca. 10 min wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt.

2.3.5 Aptamer-basierte Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie gilt heute als etablierte Methode für die Isolierung eines Proteins aus komplexen Gemischen (z.B. Zelllysat). Dennoch zielt die Forschung auf die Neu- und Weiterentwicklung von geeigneten Liganden ab. Hierbei wird auf eine kostengünstige Herstellung, keine Chargenabweichungen und Wiederverwertbarkeit der Matrix abgezielt; diese Kriterien werden von Nukleinsäuren erfüllt. Die Aptamer-basierte Affinitätschromatographie ist im Überblick in Abbildung 10 dargestellt.

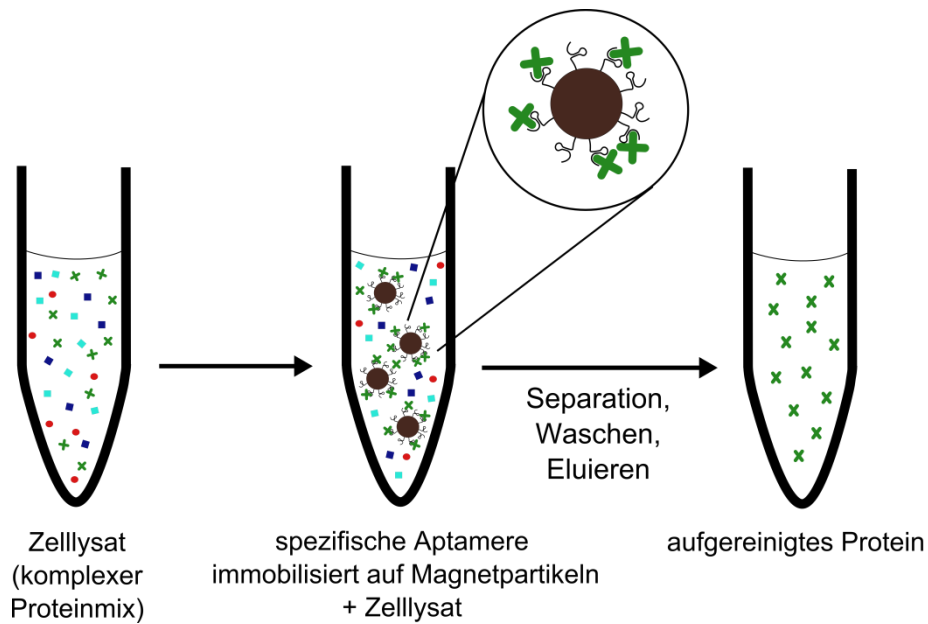


Abb. 10: Arbeitsschritte einer Aptamer-basierten Affinitätschromatographie. Für die Aufreinigung eines Proteins aus einem komplexen Gemisch, z.B. Zelllysat, werden kovalent an magnetischen Partikeln immobilisierte Aptamere und das Lysat coinkubiert. Nach der Separation der Magnetpartikel können die in Lösung befindlichen, ungebundenen Proteine entfernt werden. Geeignete Elutionsbedingungen lösen das aufzureinigende Protein von den Magnetpartikeln.

Für die Aptamer-basierte Affinitätschromatographie des zuvor rekombinant hergestellten Fusionsproteins MBP-SA wurden exemplarisch die kovalent an Magnetpartikel immobilisierten Aptamere S1C18 und S2R3#1 (s. Tab. 21 und 25) verwendet sowie eine Kontrollsequenz gleicher Länge, die nicht aus der Selektion stammte. Das aus transformierten und induzierten Zellen (pET-15b-MBP-SA in BL21(DE3)-*E. coli*-Zellen) gewonnene Zelllysat wurde im Verhältnis 1:2 mit BP (+50 mM $MgCl_2$, +20 mM KCl, +20 mM $CaCl_2$) gemischt. 20 μ l Magnetpartikelsuspension wurden mit dem gleichen Volumen Lysat/BP für 15 min schüttelnd bei RT inkubiert. Die Partikel wurden nachfolgend separiert und der Überstand abgenommen. Es folgte ein Waschschrift mit 100 μ l BP für 5 min bei RT. Die Elution der an die Aptamere gebundenen Proteine erfolgte zunächst unter milden Bedingungen mit 50 μ l Methylpyrrolidone (10%) für 10 min sowie in einem zweiten Schritt mit 50 μ l SDS (10%). Alle Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden für die Beurteilung des Erfolgs im 15%igen PAA-Gel aufgetrennt und das Zielprotein MBP-SA im Western Blot nachgewiesen.

2.4 Diversitäts-Assay

Diese Untersuchung basiert auf Bestimmung der Rückschmelztemperatur, welche durch die Diversität einer Probe nach vorangegangener Denaturierung und Rehybridisierung bestimmt wird. Dies geschieht durch eine kontinuierliche Signalmessung des in dsDNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®]-Green I (INVITROGEN[™]) während einer schrittweisen Temperaturerhöhung, die an eine Rehybridisierungsphase anschließt. Beim Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA kommt es zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals. Diese Signale lassen sich in Form von Schmelzpunkten (melting peaks) veranschaulicht werden, indem die Änderung des Signals, d.h. die negative Ableitung der Fluoreszenz (F) nach der Temperatur (T) ($-dF/dT$), gegen die Temperatur dargestellt wird [86].

Der relative Vergleich der Rückschmelzkurven mit denen eines synthetischen Standards (Abb. 11) gleicher Länge [95] erlaubt die Einschätzung der Diversität einer Probe bzw. Selektionsrunde. Er enthält definiert randomisierte Positionen in einer ansonsten konstanten Sequenz, welche von Primersequenzen zur gezielten Vervielfältigung flankiert wird. Aus jedem zufällig eingebauten Nukleotid (N) resultieren vier verschiedene Sequenzen und damit eine exponentiell ansteigende Diversität ($D=4^N$) – je nach Anzahl der variierten Basen. Das Spektrum von einem Klon bis zu 10^{12} verschiedenen Sequenzen wird durch das Einfügen von 0N (keine variable Position) bis zu 14N ($D=4^{14}$) erreicht.

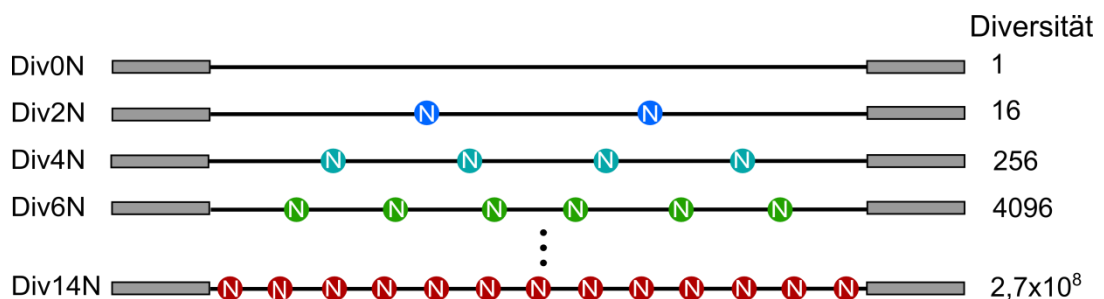


Abb. 11: Schematische Darstellung des Diversitätsstandards. Je nach Diversität sind in einer ansonsten konstanten Sequenz variable Positionen (N, farbig dargestellt) eingebaut. Primersequenzen (grau) befinden sich am 5'- und am 3'-Ende.

Der Diversitäts-Assay wurde am LightCycler[®] 480 (Real-Time PCR-Gerät von ROCHE) in 384 Multiwell-Platten durchgeführt. Pro Probe bzw. Standard wurden 300 ng dsDNA, 1 µl 10× Puffer und 1 µl SYBR[®]-Green I (1:1000) eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Die gewählte Annealingtemperatur lag 2°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur (T_m) der DNA-Fragmente. Tabelle 12 zeigt die Arbeitsschritte, in Abbildung 12 ist das Temperaturprofil des Assays dargestellt.

Tab. 12: Programm für den Diversitäts-Assay

Denaturierung	95°C		2 min
Rehybridisierung	76°C		180 min
Erneute Denaturierung	20°C-98°C	(+0,5°C pro Schritt)	7 s pro Temperaturschritt

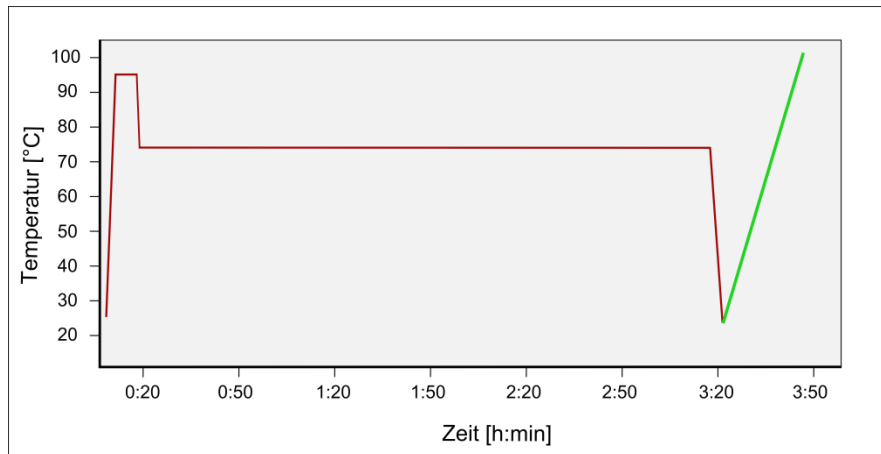


Abb. 12: Temperaturprofil des Diversitäts-Assays. Während des zweiten Schmelzvorgangs (grün) nach Rehybridisierung erfolgt alle 7 sec eine Messung des SYBR[®]-Green I-Signals.

2.5 Biochemische- und biophysikalische Methoden

2.5.1 Mikrotiterplatten-Bindungsassay (*Fluorescence dye-linked aptamer assay, FLAA*)

Die Anreicherung von Aptamersequenzen aus dem hochdiversen DNA-Pool während der SELEX und die Bindungseigenschaften selektierter Klone wurden mithilfe des FLAA [127] untersucht.

Streptavidin-beschichtete Polystyren-Mikrotiterplatten (*high capacity*, S-F8PS-HC, BIOTEZ) wurden mit der zu analysierenden ssDNA inkubiert. Bindende DNA-Moleküle lassen sich mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff detektieren (s. Abb. 13), nachdem nichtbindende Sequenzen durch Waschschriffe mit Bindungspuffer entfernt wurden.

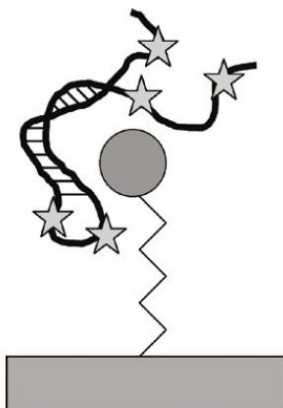


Abb. 13: Aufbau eines Mikrotiterplatten-Bindungsassays (FLAA). Das Zielmolekül ist an einer Matrix immobilisiert. Nach Inkubation mit ssDNA-Molekülen, gefolgt von zwei Waschschriffen, können spezifisch bindende Moleküle (Aptamere) mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden [127].

Nach Denaturierung bei 98°C für 3 min sowie kurzer Inkubation auf Eis wurden je Kavität 12 pmol ssDNA der zu untersuchenden Selektionsrunden bzw. Einzelklone pipettiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei RT erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 1× BP die Detektion der ssDNA mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes OliGreen® (50 µl, 1:500 in 1× BP). Die Messung der relativen Fluoreszenz (bei 530 nm) nach 9-minütiger Inkubation, bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm wurde am Fluoreszenzspektrometer POLARstar Omega (BMG LABTECH) durchgeführt.

2.5.2 Magnetpartikel-ELISA

Vorbereitend wurden die benötigten Kavitäten einer 96er-Mikrotiterplatte (BD Falcon™, Flexible Assay Platte, 96 Vertiefungen, Flachboden) mit 200 µl Blockierungspuffer für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit je 200 µl 1× Bindungspuffer (BP) gewaschen. Auf diese Weise werden unspezifische Bindungen von Streptavidin-HRP an die Innenwände der Kavitäten verhindert.

In 190 µl dH₂O wurden 10 µl magnetische Partikel pipettiert, anschließend durch Anlegen eines Magneten separiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Streptavidin-HRP (1:5000 in BP, PIERCE®, High Sensitivity, 1mg/ml) folgte eine einstündige, Inkubation schüttelnd bei RT. Für einen Waschschrift mit 200 µl 1× BP für 5 min wurden die magnetischen Partikel erneut separiert und der Überstand abgenommen. Die abermals separierten Partikel wurden mit 200 µl Substratlösung für 20 min bei RT inkubiert, bevor der Überstand ohne Partikel in eine neue Kavität überführt wurde. Die Intensität des Farbumschlags der Substratlösung ließ sich photometrisch am Elisa-Reader (SpectraMax®, MOLECULAR DEVICES) bei 405 nm messen.

2.5.3 Oberflächenplasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance, SPR*)

Mit der Oberflächenplasmonresonanz lassen sich Wechselwirkungen zwischen unmarkierten Biomolekülen über eine Änderung des Brechungsindex messen [63].

Die Bindung von Molekülen auf der Oberfläche eines SPR-Sensors kann man in Echtzeit verfolgen, wenn der Brechungsindex des Adsorbens von der umgebenden Lösung deutlich unterscheidbar ist. Dabei wird ein Interaktionspartner (hier: Streptavidin) auf einer beschichtete Gold-Sensor-/Chipoberfläche immobilisiert und der andere Partner (hier: Aptamer), in einer Lösung (1× BP), über die Oberfläche geleitet. Eine Interaktion der Moleküle führt zur Veränderung des Ausfallwinkels des eingestrahlt Lichts, die am Detektor gemessen wird (s. Abb. 14). Daraus kann die Oberflächenplasmonresonanz und somit bedeutende Parameter wie z.B. die Assoziations- und Dissoziations-Rate, die Bindungsaffinität sowie Thermodynamiken in Echtzeit verfolgt und ermittelt werden.

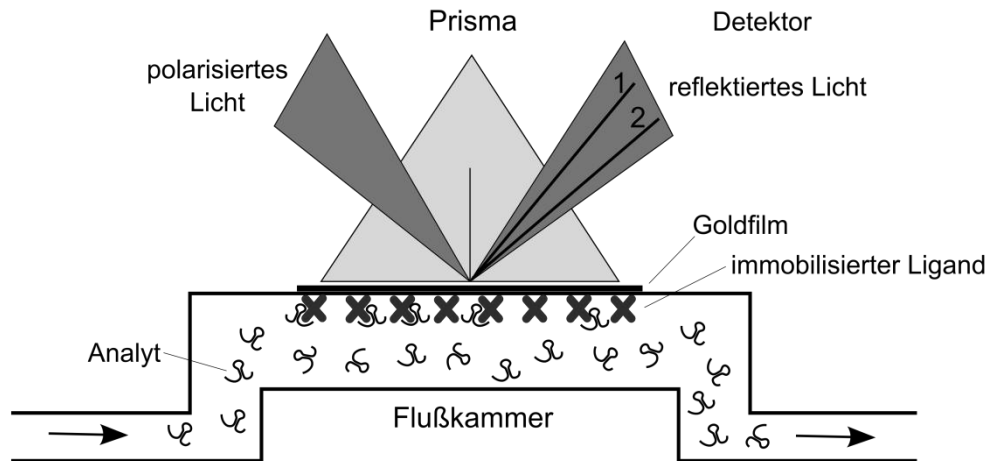


Abb. 14: Schema eines Oberflächenplasmonresonanz-Systems – Aufbau einer Durchflusszelle.

An einen goldbeschichteten Glasträger wird der Ligand (hier: Streptavidin) kovalent gebunden. Dieser Sensorchip ist in einer Durchflusszelle installiert. Polarisiertes Licht einer Lichtquelle beleuchtet die Goldoberfläche in einem bestimmten Winkel, so dass der Lichtstrahl vollständig reflektiert wird (1). Kommt es zur Interaktion zwischen Ligand und Analyt (hier: Aptamere), so verändert sich die Oberflächenplasmonresonanz (2); sie kann über den Detektor erfasst werden.

Die Kopplung des Liganden Streptavidin an die Oberfläche eines CM5-Sensorchips (GE HEALTHCARE) erfolgte bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA und 0,005% Surfactant P20 (pH 7,4) über Aminogruppen, nach Aktivierung durch 35 μl 0,02 M EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimide) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimide). 10 μl einer Streptavidin-Lösung (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ImmunoPure[®] Streptavidin, THERMO SCIENTIFIC) in 10 mM Natriumacetat (pH 4,6) wurden appliziert und zur Sättigung verbliebener aktiver Gruppen anschließend 35 μl einer 1 M Ethanolaminlösung (pH 8,5) injiziert. Als Referenz diente eine Zelle ohne immobilisiertes Zielmolekül, mit Ethanolamin besetzter Oberfläche.

Die Bestimmung der Bindungsparameter erfolgte bei 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ in 1 \times BP bei 25°C. Vor der Injektion wurde die ssDNA bei 94°C für 2 min denaturiert und dann auf RT abgekühlt. Jeweils 35 μl der ssDNA (1 μM) wurden in die Flusszellen injiziert. Falls erforderlich wurde die Oberfläche des Chips mit zweimal 10 μl NaCl (0,5 M) + MgCl_2 (0,5 M) regeneriert. Eine Korrektur der erzielten Werte erfolgte durch Subtraktion der Referenzzell-Parameter von denen aus der Flusszelle mit Ligand.

2.5.4 Nachweis der RNA-Aptamer-Bindung an Monoamin

Zunächst wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96-well, MaxiSorp[™], THERMO SCIENTIFIC) mit 20 μg DMC (Dimethylcasein) in 50 μl PBS schüttelnd für 3 Stunden inkubiert und danach zweimal mit je 50 μl MilliQ gewaschen. Die Transaminierung des Substrats DMC erfolgte durch Zugabe von 200 μM Monoamin (Serotonin, Histamin, Dopamin, Norepinephrin) und 5 mU

Transglutaminase 2 in 50 µl für 30 min schüttelnd bei 30°C. Danach wurden die Kavitäten erneut mit je 50 µl MilliQ gewaschen und die Mikrotiterplatte bei 4°C gelagert.

Eine Bindung der RNA-Aptamere (100 ng/Vertiefung, denaturiert bei 94°C für 3 min und abgekühlt auf Eis) erfolgte in 50 µl 1× BP für 40 min bei RT, anschließend folgten drei Waschschrirte mit je 50 µl 1× BP. Gebundene Nukleinsäuren ließen sich über die Amplifikation mit Qβ-Relikase (0,5 µl je Vertiefung) in 50 µl NEB4-Puffer + 2,5 mM NTPs und dem nukleinsäurebindenden Farbstoff SYBR[®] Gold (1x) für 90 min bei RT und der damit verbundenen Zunahme der relativen Fluoreszenz bei 495 nm nachweisen.

3. Materialien

Tab. 13: Oligonukleotide, Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Purimex oder Sigma[®] bezogen. Randomisierte Positionen (N = A,T,C oder G) sind blau gekennzeichnet.

Name	Verwendung	Sequenz
Bank30	Bibliothek für <i>in vitro</i> -Selektionen	5' -TGACACCGTACCTGCTCT 30N AAGCACGCCAGGGACTAT
Bank40	Bibliothek für <i>in vitro</i> -Selektionen	5' -TGACACCGTACCTGCTCT 40N AAGCACGCCAGGGACTAT
QST40	Bibliothek für <i>in vitro</i> -Selektionen	5' -ATAGGGGTTC CA ACCGGAAG 40N CCGGTTTCGGACCTCCAG
Pro5	Primer für Bank30 und 40	5' -TGACACCGTACCTGCTCT
Pro3	Primer für Bank30 und 40	5' -ATAGTCCCTGGCGTGCTT
T7Pro5	Primer für Bank30 und 40	5' -GTAATACGACTCACTATAGGACACCGTACCTGCTCT
T7TPro3	Primer für Bank30 und 40	5' -TATGCTAGTTATTGCTCAGATAGTCCCTGGCGTGCTT
T7QF	Primer für QST40 Bank (PCR-Prod. für <i>in vitro</i> -Transkription)	5' -TAATACGACTCACTATAGGGGTTC CA ACCGGAAG
QR	Primer für QST40 Bank (PCR-Prod. für <i>in vitro</i> -Transkription)	5' -GGGCTAACAGTGCGGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG
QR3	Primer für RT-PCR der QST40 Bank	5' -CTGGAGGTCCGAAACCGG
QF5	Primer für RT-PCR der QST40 Bank	5' -GGGGTTC CA ACCGGAAG
Div0N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCGGTAATGTGTAAATCTACTTCCTTCTC AGCGCCCCCGTGGCTGCAGGCATGCAAG
Div2N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCGGTAATGTGTAAAN N CTACTTCCTTCTC AG N GCCCCCGTGGCTGCAGGCATGCAAG
Div4N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCGGTAATG NG TAAATCT N CTTCCTT CNC AGCGCC CN CGTGGCTGCAGGCATGCAAG
Div6N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCGG NA ATGTG NA AAATCT N CTTCCT NTCTC AG CN CCCC NG GCTGCAGGCATGCAAG
Div8N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCGG NA ATG NG TAA NT CTAN TTCCN TCTC NGCGCN CCCC NG GCTGCAGGCATGCAAG
Div10N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTACCG NT AA NG TG NA AA NT CTAN TTCN TT CNC AG NGCCN CC NG GCTGCAGGCATGCAAG
Div12N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTAC CNG T NATNT G NA AA TCN AC NTCN TT NTC AG NGCN CC NG T NG CTGCAGGCATGCAAG
Div14N	Diversitätsstandard	5' -TTCGAGCTCGGTAC CNG NA TNTNT AA NTNT AC NTN CTT TNTN AG CNCN CCC NTN GCTGCAGGCATGCAAG
Ri3	Primer für Diversitätsstandard	5' -CCAAGCTTGCATGCCTGCAG
Ri5	Primer für Diversitätsstandard	5' -GGGAATTCGAGCTCGGTACC
SiA1Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAATCACGATAGTCCCTGGCGTG CTT

SiA2Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGACGATGTATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA3Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTAGGCATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA4Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGATGACCAATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA5Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACAGTGATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA6Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGCCAATATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA7Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGACAGATCATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA8Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACCTTGAATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA9Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA10Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGATAGCTTATAGTCCCTGGCGTG CTT
SiA11Pro3	Index-Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGGCTACATAGTCCCTGGCGTG CTT
SPro5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCC GACATGACACCGTACCTGCTCT
GiAPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTATCACGACACCGTACCTGCTCT
GiBPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTCGATGTACACCGTACCTGCTCT
GiCPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTTTAGGCACACCGTACCTGCTCT
GiDPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTTGACCAACACCGTACCTGCTCT
GiEPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTACAGTGACACCGTACCTGCTCT
GiFPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTGCCAATACACCGTACCTGCTCT
GiGPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTCAGATCACACCGTACCTGCTCT
GiHPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTACTTGAACACCGTACCTGCTCT
GiHPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTGATCAGACACCGTACCTGCTCT
GiHPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTTAGCTTACACCGTACCTGCTCT
GiHPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTGGCTACACACCGTACCTGCTCT
GiHPro3	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTCTTGTAAACACCGTACCTGCTCT
PEPro3	Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCCTGC TGAACCGCTCTTCCGATCTAGTCCCTGGCGTGCTT
GiAQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTATCACGGGGTTCCAACCGGAAG
GiBQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTCGATGTGGGTTCGAACCGGAAG
GiCQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTTTAGGCGGGTTCCAACCGGAAG
GiDQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTTGACCAGGGTTCCAACCGGAAG

GiEQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTACAGTGGGGTTCCAACCGGAAG
GiFQ5	Adapter-Primer	5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCTGCCAATGGGGTTCCAACCGGAAG
PEQ3	Primer	5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGC TGAACCGCTCTTCCGATCTGGAGGTCCGAAACCGG
tmpi	Kontroll-Oligo	5' -TGACACCGTACCTGCTCTATGCCTATCATGGGCAACCACGCC AGGGACTAT

Tab. 14: Vektoren

Name	Verwendung	Bezugsquelle
pET-21	Proteinexpression	INVITROGEN™
TOPO	TOPO® TA-Klonierung	INVITROGEN™
pUC18	Kontrolle der Transformation	INVITROGEN™

Tab. 15: Prokaryotische Zellen

Name	Verwendung	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5α	TOPO® TA-Klonierung	INVITROGEN™
<i>E. coli</i> DH10b	Glycerinkulturen rekombinanter Plasmide	INVITROGEN™
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>in vivo</i> Expression rekombinanter Proteine	INVITROGEN™

Tab. 16: Enzyme

Name	Hersteller	Aktivität	Verwendung
Taq-Polymerase	ROBOKLON, EURX	5 U/μl	DNA-Amplifikation
Thermostabile Pyrophosphatase	ROBOKLON, EURX	20 U/μl	Umsetzung von organischem Pyrophosphat zu Ortho-Phosphat
T7-Polymerase	ROBOKLON, EURX	25 U/μl	RNA-Synthese
DNase (RQ1)	PROMEGA	1 U/μl	Verdau von Matrizen-DNA nach <i>in vitro</i> Transkription
Qβ-Replikase	BIOZYM, EPICENTRE®	1 U/μl	Isothermale RNA-Amplifikation
Transglutaminase 2	ZEDIRA	5 mU/μl	Monoamylierung von DMC mit Serotonin, Dopamin, Histamin oder Norepinephrin

Tab. 17: Kits

Name	Hersteller	Verwendung
Plasmid na -OLS®	OMNI LIFE SCIENCE GMBH & Co. KG	Plasmid-Präparation
TOPO® TA Cloning®-Kit	INVITROGEN™	Klonierung
T7 Transkriptionskit	ROBOKLON, EURX	<i>in vitro</i> -Transkription
sbeadex®	LGC GENOMICS®	DNA-Aufreinigung
GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up DNA Purifikation-Kit	ROBOKLON, EURX	DNA-Aufreinigung

Tab. 18: Puffer und Lösungen

10x TBE-Puffer	0,9 M 0,9 M 0,02 M	Tris Borsäure EDTA	10x Ladepuffer (Agaosegel-elektrophorese)	0,1% 0,1% 0,5% 0,1 M 50%	Xylencyanol Bromphenolblau SDS EDTA Glycerol
10x PBS-T	1,7 mM 5,2 mM 150 mM 0,5%	Kaliumdihydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat NaCl Tween	LB-Medium (fest)	1% (w/v) 0,5% (w/v) 10 mM 1,3% (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl Agar
LB-Medium (flüssig)	1% (w/v) 0,5% (w/v) 10 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl	2YT-Medium	1,6% 1% 10 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl
TSS-Medium (steril filtriert)	85% 10% (w/v) 5% 50 mM	2YT-Medium PEG 8000 DMSO MgCl ₂	SOC-Medium	2% (w/v) 0,5% (w/v) 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MgSO ₄ MgCl ₂ Glucose
Lysepuffer	50 mM 150 mM 1 mM	Tris-HCl (pH 8,0) NaCl EDTA	10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25 M 2 M 1%	Tris Glycin SDS
3x Ladepuffer (SDS-PAGE)	150 mM 30% 6% 0,3% 300 mM	Tris-HCl (pH 6,8) Glycerin SDS Bromphenolblau DTT	Comassie-Färbelösung	0,1% (w/v) 40% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R250 Methanol Essigsäure (100%)
Entfärbelösung	20% (v/v) 10% (v/v)	Ethanol Essigsäure (100%)	Blot-Puffer (WB)	48 mM 39 mM 20% 0,0375%	Tris Glycin Methanol SDS
10x Bindungspuffer (BP), SELEX, pH 7,4	200 mM 50 mM 20 mM 20 mM 1,4 M 0,5%	Tris MgCl ₂ CaCl ₂ KCl NaCl Tween [®] 20	10x Diversitäts-Assay-Puffer (DA)	200 mM 100 mM 2,5 M 0,3%	MOPS EDTA NaCl Brij-700
Blockierungspuffer (Magnetpartikel-ELISA)	1x 0,5% (v/v) 3%	PBS Tween BSA	Substrat-Lösung (Magnetpartikel-ELISA)	1 Tabl. 10 ml 10 ml 10 µl	ABTS Zitronensäure (50 mM) Natrium-Citrat (50 mM) H ₂ O ₂ (30%)

Tab. 19: Chemikalien

Name	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC)	SIGMA-ALDRICH [®]
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	CALBIOCHEM [®]
2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure (MES)	SIGMA-ALDRICH [®]
2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfonsäure (ABTS)	SIGMA-ALDRICH [®]
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure(MOPS)	ROTH
ABIL WE09	EVONIK
Acrylamid	ROTH

Agarose	INVITROGEN™
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK
Ammoniumsulfat	MERCK
Ampicillin	SIGMA-ALDRICH®
Biotin	SIGMA-ALDRICH®
Borsäure	MERCK
Bovines Serum Albumin (BSA)	BIOLABS®
Brij® 700	SIGMA-ALDRICH®
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH®
Calciumchlorid	MERCK
Coomasie Brilliant Blue R250	PERBIO/PIERCE
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	QBIogene
Dimethylcasein (DMC)	SIGMA-ALDRICH®
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-ALDRICH®
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA-ALDRICH®
Essigsäure	MERCK
Ethanol	MERCK
Ethanolamin	SIGMA-ALDRICH®
Ethidiumbromide	INVITROGEN™
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MERCK
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	MERCK
Glucose	MERCK
Glycerol	MERCK
Glycin	MERCK
Hefeextrakt	BECTON DICKINSON
Isobutanol	MERCK
Isopropyl-β-D-thio-Galactopyranose (IPTG)	FERMENTAS
Kaliumchlorid	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK
Magnesiumchlorid	MERCK
Magnesiumsulfat	MERCK
Manganchlorid	MERCK
Methanol	MERCK
Methylpyrrolidone	SIGMA-ALDRICH®
Mineralöl	SIGMA-ALDRICH®
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	INVITROGEN™
Natriumacetat	MERCK
Natriumchlorid	MERCK
Natrium-Citrat	MERCK
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK
Natriumhydroxid	MERCK
Natriumlaurylsulfat (SDS)	BIO-RAD
N-hydroxysuccinimide (NHS)	SIGMA-ALDRICH®
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	QBIogene
OliGreen®	MOLECULAR PROBES™
Polyethylenglycol (PEG 8000)	MERCK
Streptavidin	THERMO FISCHER
Surfactant P20	BIACORE
SYBR Gold	MOLECULAR PROBES™
SYBR Green I	MOLECULAR PROBES™
Tegosoft DEL	EVONIK
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	MERCK
Trypton	BECTON DICKINSON
Tween® 20	RIEDEL-DE HAËN
Wasserstoffperoxid (30%)	FLUKA
Xylencyanol	MERCK
Zinksulfat	FLUKA
Zitronensäure	MERCK

4. Ergebnisse

4.1 Erste *in vitro*-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 10 Runden

Die erste *in vitro*-Selektion funktioneller Nukleinsäuren (ssDNA) gegen das Zielmolekül Streptavidin auf magnetischen Partikeln (Dynabeads® M-280 Streptavidin, INVITROGEN™) erfolgte halbautomatisiert mithilfe des KingFisher Flex über 10 Runden. Die initial eingesetzte DNA-Bibliothek besaß 40 randomisierte Nukleotidpositionen (Bank40). Um arbeitsintensive und systematische Fehler hervorrufende Schritte zur Einzelstranggenerierung einzusparen wurde das gereinigte PCR-Produkt vor Inkubation mit dem Zielmolekül in 1× BP für 3 min auf 94°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Erhöhung der Stringenz wurden im Verlauf der Selektion die Anzahl der Waschschrte und das Volumen erhöht, sowie die Menge eingesetzter Nukleinsäuremoleküle und die Inkubationszeit mit dem Zielmolekül reduziert. Anstelle eines separaten Elutionsschrittes zum Lösen der Zielmolekül-gebundenen Sequenzen wurden die 50 µl magnetischer Partikel aus der Selektion direkt in die PCR eingesetzt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte für die nächste Selektionsrunde erfolgte mit magnetischen Partikeln. Die Parameter der Selektion sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tab. 20: Parameter der ersten Streptavidin-SELEX, Selektionsrunden 1 bis 10

Runde	ssDNA [µg]	ssDNA [pmol]	Streptavidin -Beads [µg]	Streptavidin [pmol]	Inkubations -zeit [min]	Wasch-schritte	PCR-Zyklen
1	50	2000	1000	70	50	1× 500 µl	15
2	3	120	500	35	50	1× 500 µl	15
3	2	80	500	35	50	2× 500 µl	15
4	0,8	32	500	35	50	2× 500 µl	15
5	0,2	8	500	35	50	2× 1000 µl	15
6	1,4	56	500	35	50	2× 1000 µl	14
7	2,8	112	500	35	50	2× 1000 µl	12
8	3	120	500	35	50	2× 1000 µl	10
9	2	80	500	35	26	2× 1000 µl	9
10	2	80	200	14	26	2× 1000 µl	8

Eine Vereinzelung der im Pool der zehnten Selektionsrunde befindlichen Sequenzen erfolgte zunächst durch Ligation der PCR-Produkte in den TOPO®-Vektor über TA-Klonierung. Durch Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli*-DH5α-Zellen und anschließendes Ausstreichen auf ampicillinhaltigen Agarplatten wurden Kolonien mit einzelnen Aptamersequenzen generiert. Die isolierte Plasmid-DNA von 25 verschiedenen Klonen wurde durch die Serviceabteilung des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik (Berlin) nach Sanger

[91] sequenziert. Die Sequenzen dieser Klone, sortiert nach Familien und mit Angabe relevanter Motive, sind ohne flankierende Primersequenzen in Tabelle 21 aufgeführt.

Tab. 21: Sequenzen der isolierten Streptavidin-Aptamer-Klone. Gleiche Sequenzen sind in Gruppen zusammengefasst, mit Angabe wiederkehrender Motive. Ausgewählte Klone für spätere Bindungsstudien sind gekennzeichnet (*,komplementäre Orientierung **)

Gruppe	Klone	Sequenzen	Motive
1.1	S1C1 S1C3	5' -AATAGCCCCCTGACGCAAGGGTTAGAGCAGTAATCACGTT	1,2
1.2	S1C25	5' -AATAGCCCCCTGACGCAAGGGTTAGAGCAGTAATCATGGT	1,2
2	S1C2 S1C4 S1C5 S1C11 S1C13 S1C14 S1C16	5' -GACTCCGGGACATGCCCATGTCGCAATGGTGGCCCGGATT	1,2
3	S1C6 S1C15 S1C20	5' -CGGGTTCACCGTTGCGTCACGGGGCAATTCACCACTCGCC	1,2
4	S1C8**	5' -ACTTTAGGGCTAACCTGCGATCGGTGCGTACCCCATGCTC	1,2,3
5	S1C9*	5' -ACCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGTGAGCAGGGGG	1,2,3
6.1	S1C10* S1C19 S1C23	5' -ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTTCGGAGTTACTTT	1,2
6.2	S1C18*	5' -ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTTCGGAGATACTTT	1,2
7	S1C12 S1C17 S1C21	5' -GTGTAGGATCATCGCCCCACGACGCAGTGGGTGATCGTA	1
8	S1C22	5' -CACGCGACCGGCGCAGGTCTGAGGGCAGGCCAGTAATAT	1,2,3
9	S1C24	5' -ATAAGCACGCCAGGGACTATGACACCGTACCTGCTCT	1,2

Von den 25 sequenzierten Klonen wiesen 24 ein vollständiges Insert auf. Insgesamt konnten 9 verschiedene Sequenzfamilien (Konsensussequenzen) identifiziert werden. Da für die Selektionsrunden das gereinigte, denaturierte PCR-Produkt (dsDNA) eingesetzt wurde, ist zu beachten, dass es sich bei einem Aptamer auch um den hier nicht dargestellten Komplementärstrang handeln kann.

Bei dem für weitere Analysen und Bindungsstudien ausgewählten Klon S1C8a (s. Tab. 21: mit ** gekennzeichnet) handelt es sich um den komplementären Strang (antisense). Die weiteren Klone (s. Tab. 21: mit * markiert) wurden als sense-Strang synthetisiert. Die Klone S1C10 und S1C18 unterscheiden sich nur in einer Base an Position 34.

Für die Identifizierung wiederkehrender Motive (>10 bp) in den 9 Sequenzfamilien wurde das Analyse-Programm MEME (Version 4.6.1, [64], Einstellungen: Minimalmotiv 3 Basen/Maximalmotiv 10 Basen, [1]) verwendet, da der verwendete Datensatz sehr gering war.

Die am häufigsten auftretenden Motive zeigt Abbildung 15:

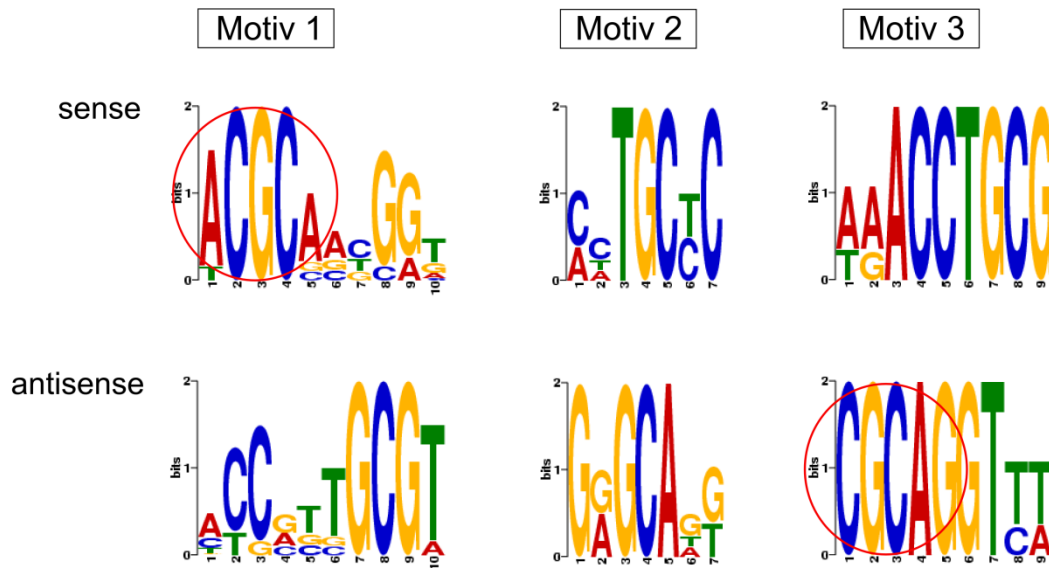


Abb. 15: WebLogo-Darstellung häufig auftretender Sequenzmotive in den 9 Gruppen der nach Sanger sequenzierten Klone. Mit dem Sequenzanalyseprogramm MEME erstellte Motive mit einer Länge von 3 bis 10 Basen; es wurde auch der Gegenstrang berücksichtigt. Rote Kreismarkierungen weisen auf das Motiv ACGC hin.

Besonders das Motiv 1 tritt in allen Sequenzgruppen auf, zudem besitzen alle Motive einen GC-Gehalt von über 50%. Die Basenabfolge ACGC aus Motiv 1 findet sich darüber im komplementären Strang der Motive 1 und 3.

4.1.1 Überwachung des Diversitätsverlustes mittels Diversitäts-Assay

Die Abnahme der Diversität im Selektionsverlauf konnte mithilfe des Diversitäts-Assays [95] belegt werden. Diese Methode basiert auf der Beobachtung, dass die Rehybridisierung denaturierter Nukleinsäuren bei einem Gemisch verschiedener Sequenzen langsamer und unvollständiger stattfindet als bei einem Einzelklon [12]. Der in dieser Untersuchung mitgeführte interne Standard gleicher Länge beinhaltet, je nach definierter Diversität, eine unterschiedliche Anzahl variabler Positionen (siehe 2.4) und dient dem raschen Abschätzen des Diversitätsverlustes.

Graphisch dargestellte Rückschmelzkurven des Diversitätsstandards und der Selektionsrunden (s. Abb. 16) zeigen die Verschiebung einer niedrigen Schmelztemperatur bei Proben mit hoher Diversität (Div14N und rd2) hin zu einer hohen Schmelztemperatur bei Proben niedriger Diversität (Runde 10) bzw. einem Einzelklon (Div0N):

Während die Schmelztemperatur des DNA-Pools aus der zweiten und dritten Selektionsrunde noch bei ca. 78°C liegt, so steigt sie ab der vierten Runde auf 91 - 93°C. Verglichen mit dem

Standard entspricht dies für die Runden 2 und 3 einer Diversität von $2,7 \times 10^8$; ab Runde 3 kann davon ausgegangen werden, dass der Pool noch ca. 4000 verschiedene Sequenzen enthält.

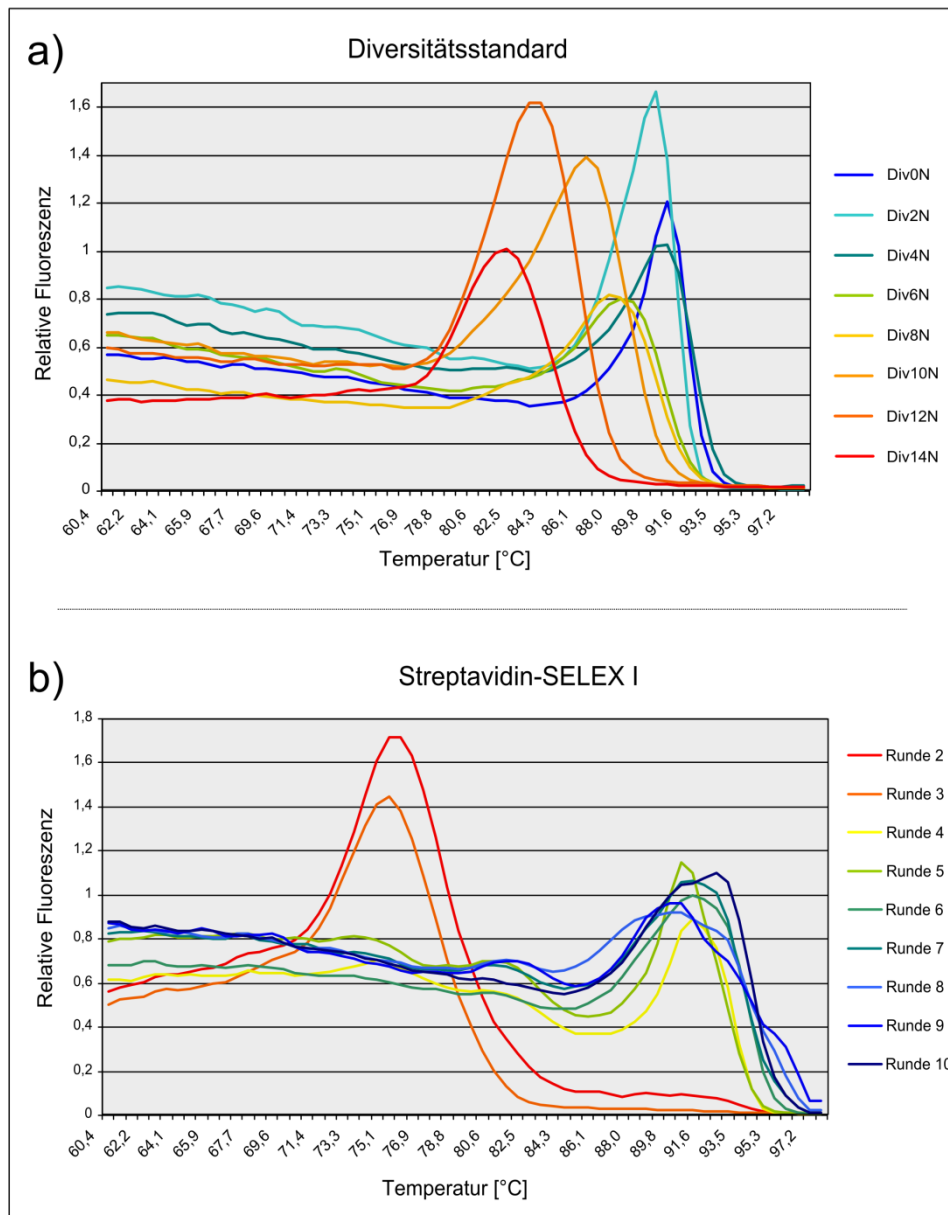


Abb. 16: Messung der Fluoreszenzänderungen während des Rückschmelzvorgangs. a) Diversitätsstandards (Div0N bis Div14N), b) Nukleinsäurepools der Streptavidin-Selektionsrunden (Runde 2 bis Runde 10).

4.1.2 Kontrolle der Anreicherung funktioneller Sequenzen mittels FLAA

Mit dem Mikrotiterplatten-Bindungsassay (FLAA, [127]) konnte der Erfolg der Selektion, eine Anreicherung funktioneller Sequenzen über die Selektionsrunden, nachgewiesen werden. Äquivalent zu den Selektionsbedingungen wurde der amplifizierte Pool jeder Selektionsrunde in $1 \times$ BP denaturiert (3 min, 94°C) und je Kavität einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte 12 pmol DNA eingesetzt. Als Kontrolle dienten Kavitäten mit Streptavidin-Biotin-Komplexen. Nach

einer zweistündigen Inkubation bei RT erfolgte der Nachweis gebundener ssDNA mit dem nukleinsäurebindenden Farbstoff OliGreen®. Die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 17 dargestellt.

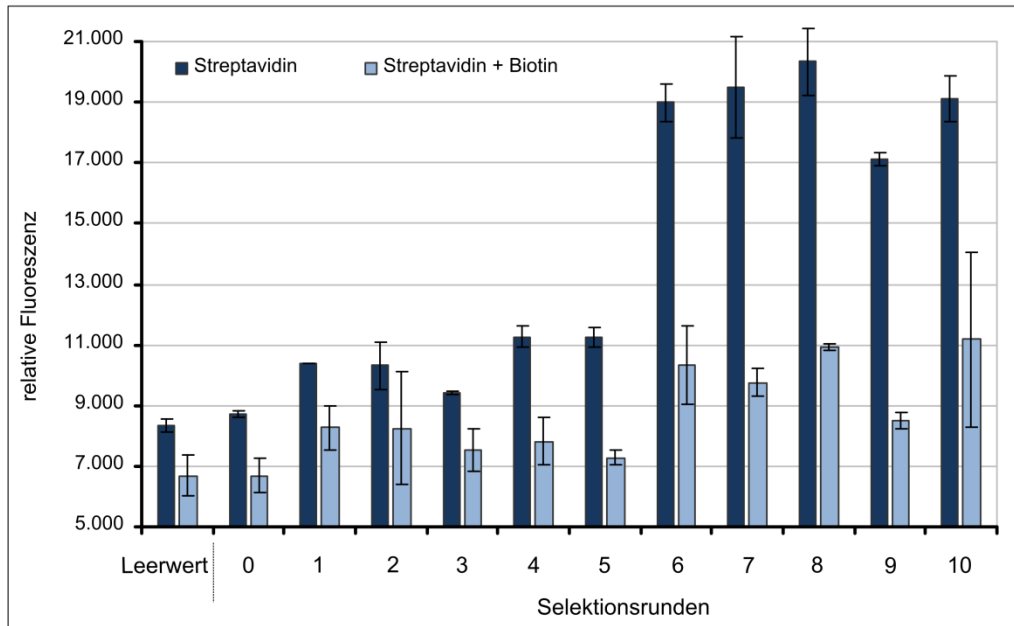


Abb. 17: Nachweis der Anreicherung bindender Sequenzen über 10 Selektionsrunden mittels FLAA. Denaturiertes PCR-Produkt aus den Selektionsrunden 1 bis 10 wurde in den Kavitäten einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Der einzelstrangbindende Farbstoff OliGreen® ermöglicht die Detektion gebundener Nukleinsäuren. Als Kontrolle dienen Kavitäten mit einem Streptavidin-Biotin-Komplex. Abgebildet ist die relative Fluoreszenz gegen die Selektionsrunde.

Eine leichte Zunahme der relativen Fluoreszenz ist bereits ab der ersten Runde zu erkennen, jedoch erst ab Runde 5 steigt das Signal und damit die Anzahl bindender Nukleinsäuren deutlich an. Eine Bindung an den Streptavidin-Biotin-Komplex (Negativ-Kontrolle) ist hingegen kaum zu beobachten.

4.1.3 Hochdurchsatzsequenzierung aller Selektionsrunden

Für die Hochdurchsatzsequenzierung mittels Solexa-Technologie (Genome Analyzer GA2, ILLUMINA) in der Serviceabteilung des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik (Berlin) wurden vorbereitend Adapter (21 Basen lang) und Barcodes (6 Basen lang; zur späteren Identifizierung der Selektionsrunde) über spezielle Primer (SiA1Pro3 bis SiA10Pro3, SPro5) über eine PCR eingefügt. Zur gleichzeitigen Sequenzierung aller Selektionsrunden wurden die PCR-Produkte gereinigt und gemischt (jeweils 500 ng). Insgesamt konnten ca. 13 Mio. Sequenzen erfasst werden. Aufgrund der eingefügten Markierungssequenz (Barcode) konnten ca. 7 Mio. Klone den jeweiligen Selektionsrunden zugeordnet werden (s. Tab. 22).

Tab. 22: Datensatz der Solexa-Sequenzierung (Illumina), mit Zuordnung der Markierungssequenzen zu den jeweiligen Selektionsrunden. Inserts besitzen eine Länge von 40 bp.

Sequenzen	Selektionsrunde	Datensatz (identifizierte Sequenzen, total)	Anteil [%]	Sequenzen mit insert (total)	Anteil mit insert [%]
insgesamt mit Barcode		12.852.327	100	entf.	entf.
		7.219.413	56,2	5.538.281	43,1
S1A01	0 (Bank 40)	723.183	5,6	678.306	5,3
S1A02	1	221.245	1,7	204.388	1,6
S1A03	2	1.004.467	7,8	896.827	7,0
S1A04	3	753.614	5,9	641.239	5,0
S1A05	4	599.471	4,7	542.646	4,2
S1A06	5	319.493	2,5	280.205	2,2
S1A07	6	722.320	5,6	605.841	4,7
S1A08	7	711.308	5,5	637.870	5,0
S1A09	8	307.193	2,4	270.572	2,1
S1A10	9	554.912	4,3	495.132	3,9
S1A11	10	435.968	3,4	285.255	2,2

Eine erste bioinformatische Auswertung geschah zunächst durch Zuordnung der Sequenzen zu der jeweiligen Selektionsrunde und anschließend Sortieren nach Häufigkeit. Für weitergehende Betrachtungen und bioinformatische Analysen wurde nur die 100 häufigsten Sequenzen verwendet. Eine Liste der Top 20 befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Anhand ihrer Häufigkeit, speziellen Sequenzmotive bzw. hohem GC-Gehalt ließen sich einige Klone als potenzielle Binder identifizieren und ohne die flankierenden Primersequenzen in Bindungsstudien testen (s. Tabelle 23). Die Nomenklatur richtet sich nach der Selektion (S1), der Selektionsrunde (R10) und der Häufigkeit (#1-10).

Tab. 23: Aptamer-Sequenzen der 10. Selektionsrunde, die als mögliche Binder identifiziert und für Bindungsstudien chemisch synthetisiert wurden. Ergänzend angegeben sind enthaltende relevante Sequenzmotive aus Abb. 18.

Klon	Sequenz	Motive
S1R10#1	5' - TCTTCCCATTTCGGAGGCCTGCGCCGGCCGCGTCCGAGGGT	4, 5
S1R10#1a	5' - ACCCTCGGACGCGCGCCGGCCGCGCAGGCCTCCGAATGGGAAGA	4, 5
S1R10#2	5' - GATTGCCCTCGACGCAGAGGTCTGAGTTGGTACAAATTA	4
S1R10#4	5' - CACGCGACCGGCGCAGGTCTGAGGGCAGGTCCAGTAATAT	4, 5
S1R10#6	5' - ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGTTTAT	4, 5
S1R10#10	5' - ACTTGGACCCGATGCCCGTGGCGCAACGGTCCGGTCCCTTC	4

Bei dem ausgewählten Klon S1R10#1 handelt es sich um die häufigste Sequenz (10%) des Pools nach der 10. Selektionsrunde. Da für die Selektion gereinigtes und denaturiertes PCR-Produkt verwendet wurde, können sowohl der sense-, als auch der antisense-Strang als potenzielle Binder in Frage kommen. Folglich wurde auch der komplementäre Strang (S1R10#1a) für Bindungsstudien ausgewählt. Die weiteren Klone stellen immerhin noch 5% des Pools (S1R10#4), bzw. 3% bei S1R10#6 und 1% bei S1R10#10 dar.

Die bereits mit der Sanger-Sequenzierung ermittelten Klone (s. 4.1) konnten auch unter den 100 häufigsten Sequenzen (10. Selektionsrunde) der Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert werden: Klon S1C10 befand sich unter den Top 20 an Position 17 in der Rangliste, S1C9 an Stelle 42, S1C8a an Position 62 und S1C18 konnte in der Rangliste an Position 86 identifiziert werden (S1C8a = S1R10#62a; S1C9 = S1R10#42; S1C10 = S1R10#17; S1C18 = S1R10#86).

Verfolgt man die relative Häufigkeit der durch Sanger-Sequenzierung gewonnenen und durch NGS identifizierten Klone über die Selektionsrunden, dargestellt in Abbildung 18, so wird deutlich, dass die häufigsten Sequenzen der 10. Runde (S1R10#1 und #2) erst ab der fünften Runde unter den Top 100 observiert werden können. Der Anteil einiger weiterer Klone, darunter auch die nach Sanger sequenzierten Klone, nimmt ab der sechsten Runde leicht wieder ab (S1R10#4, #6, #10 und S1C10).

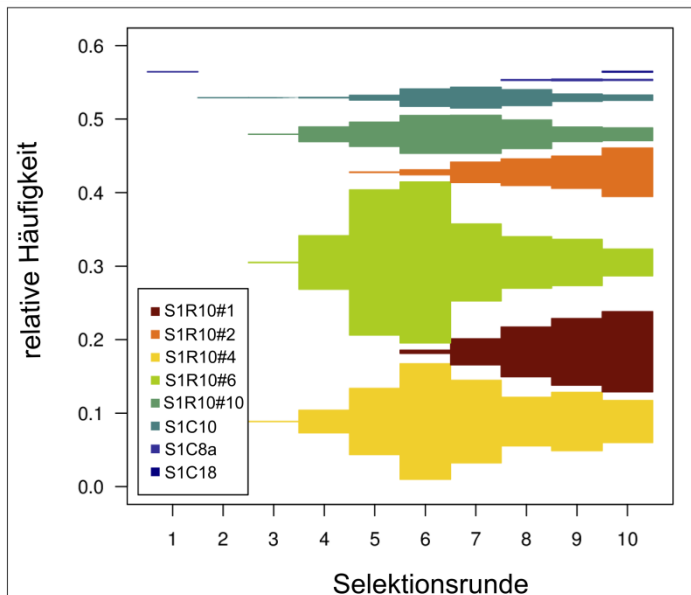


Abb. 18: Relative Häufigkeit der im Pool der 10ten Runde identifizierten Klone über alle Selektionsrunden

Auch hier wurden relevante Motive durch eine Analyse nach dem MEME-Algorithmus [1] (Parameter: Minimalmotiv 3 Basen; Maximalmotiv 10 Basen, für Motiv 4, 40 Basen für Motiv 5) in den 100 häufigsten Sequenzen der 10. Selektionsrunde gefunden (s. Abb. 19). Da die Selektion mit denaturierter dsDNA durchgeführt wurde, fanden auch die komplementären Stränge Berücksichtigung.

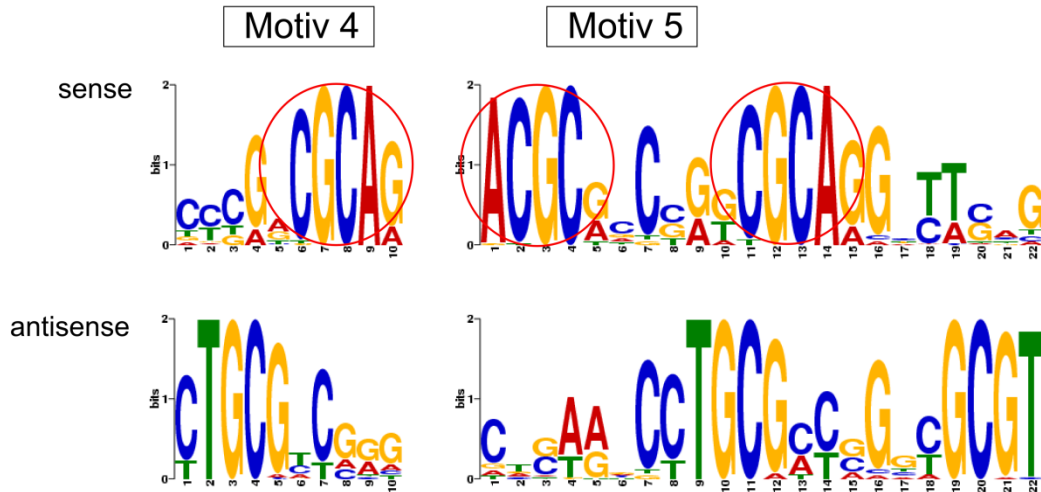


Abb. 19: Relevante Motive der 10. Selektionsrunde der ersten Streptavidin-SELEX. Für die Darstellung der Motive wurden die 100 häufigsten Sequenzen der 10. Selektionsrunde mit dem Programm MEME analysiert (Motivlänge minimal 3, maximal 10 bzw. 40); auch der Gegenstrang wurde berücksichtigt. Rote Kreismarkierungen kennzeichnen das Motiv ACGC.

Motiv 4 konnte in allen der 100 häufigsten Sequenzen nachgewiesen werden, Motiv 5 in etwa der Hälfte (49%). Als entscheidend für das Bindungsverhalten – und damit für die Anreicherung in der Selektion – erscheint jedoch nicht nur das Motiv ACGC (s. Abb. 19 und 20a) zu sein, sondern auch ein Palindrom mit der Basenabfolge ACGCNNNNNCGCA (s. Motiv 5, Abb. 19). In der Abfolge der Selektionsrunden lässt sich dieses Palindrom wiederholt nachweisen (s. Abb. 20b).

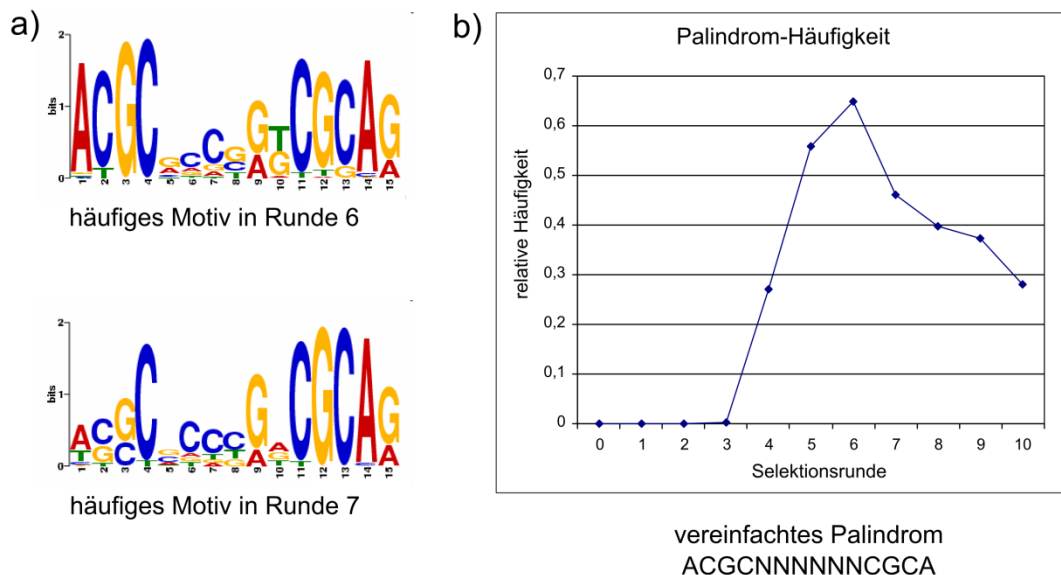


Abb. 20a/b: Sequenzmotive und deren Verteilung a) Überrepräsentierte Motive einzelner Selektionsrunden, b) Häufigkeitsverteilung des vereinfachten Palindroms ACGCNNNNNCGC über die Selektionsrunden. Die in a) dargestellten Motive wurden mit dem Analyseprogramm MEME generiert.

Die in den Sequenzen der Hochdurchsatzsequenzierung ermittelten Motive stimmen in Abschnitten (ACGC) mit Sequenzen aus der Sanger-Sequenzierung (4.1) überein. Das in den Runden 3 bis 10 relevante Palindrom ACGC>NNNNNCGCA konnte in dem verhältnismäßig kleinen Pool der Sanger-Klone nicht nachgewiesen werden. In wie weit dieses Palindrom für die Bindung eines Aptamers an das Zielmolekül Streptavidin verantwortlich ist kann u.a. durch Sekundärstrukturvorhersagen nach dem Zuker-Algorithmus [133] ermittelt werden.

4.2 Zweite *in vitro*-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden

In eine zweite *in vitro*-Selektion gegen Streptavidin flossen die in Kapitel 4.1 gewonnenen Erkenntnisse ein: Die eingesetzte Startbibliothek umfasste nur noch 30 randomisierte Positionen (Bank30), die Anzahl der Selektionsrunden wurde auf 3 reduziert, die Inkubationszeit auf zwei Stunden heraufgesetzt und die Anzahl der Waschschrte mit jeder Runde erhöht — womit die Stringenz während der Selektion gesteigert wurde.

Vor Beginn jeder Selektionsrunde wurde der DNA-Pool in 1× BP zur Einzelstranggenerierung für 3 min auf 94°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Das Zielmolekül Streptavidin befand sich auf magnetischen Partikeln (Dynabeads[®] M-280 Streptavidin, INVITROGEN[™]), Die SELEX wurde halbautomatisiert am KingFisher Flex durchgeführt. Die Elution gebundener Sequenzen erfolgte unspezifisch durch EDTA (5 mM) und 10-minütiges Erhitzen auf 94°C. Losgelöste Nukleinsäuren konnten mithilfe magnetischer Partikel (sbeadex[®]) gereinigt und anschließend in der PCR (Annealing-Temperatur 59°C) vervielfältigt werden. Tabelle 24 zeigt die Parameter dieser Selektion.

Tab. 24: Übersicht der Parameter für die zweite Selektion von Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden

Runde	ssDNA [µg]	ssDNA [pmol]	Streptavidin-Beads [µg]	Inkubationszeit [min]	Wasch-schritte	PCR-Zyklen
1	50	2293	1000	120	2× 1000 µl	20
2	1,5	69	100	120	3× 1000 µl	20
3	1,5	69	100	120	4× 1000 µl	20

Die Identifizierung angereicherter Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung der Selektionsrunden mit der *next-generation sequencing*-Technologie Solexa (ILLUMINA) und anschließender bioinformatischer Auswertung. Dazu wurden die barcode-enthaltenden Primersequenzen GiAPro3 bis GiCPro3 (s. Tab. 13) verwendet.

4.2.1 Kontrolle der Anreicherung funktioneller Sequenzen mittels FLAA

Die Anreicherung bindender Sequenzen in den drei Runden der zweiten Selektion wurde, wie in der ersten Selektion (vgl. 4.1.2) mit einem FLAA nachgewiesen. Die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzmessungen sind in Abbildung 21 dargestellt.

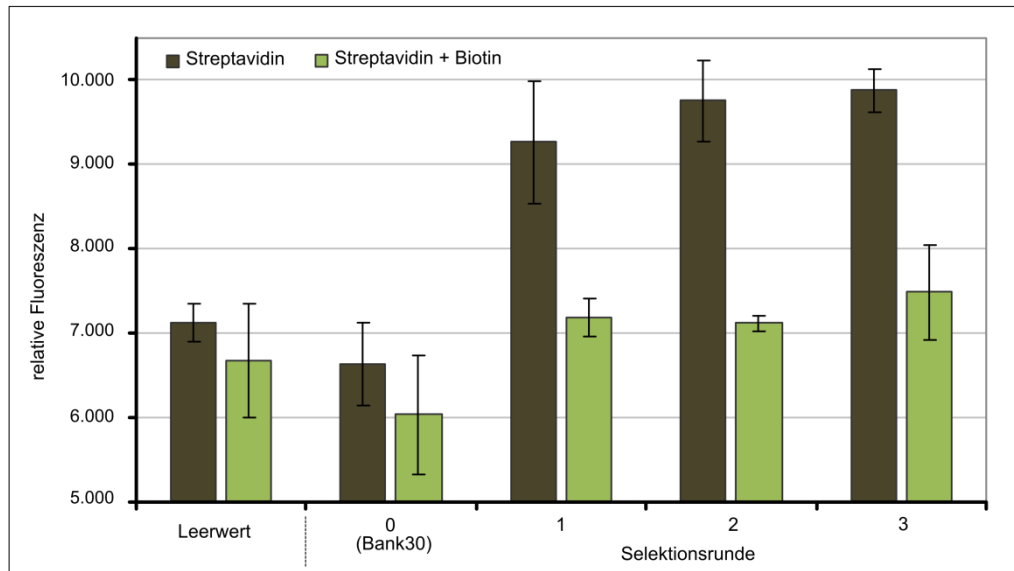


Abb. 21: Nachweis der Anreicherung bindender Sequenzen über 3 Selektionsrunden mittels FLAA. Denaturiertes PCR-Produkt aus den Selektionsrunden 1 bis 3 wurde in den Kavitäten einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Der einzelstrangbindende Farbstoff OliGreen® ermöglicht die Detektion gebundener Nukleinsäuren. Als Kontrolle dienten Kavitäten mit einem Streptavidin-Biotin-Komplex. Gezeigt ist die relative Fluoreszenz gegen die Selektionsrunde.

Bereits ab der ersten Runde nimmt die relative Fluoreszenz und damit die Anzahl bindender Sequenzen im Vergleich zur Start-Bibliothek zu. Die Spezifität der akkumulierten Nukleinsäuren wird durch die erheblich schwächere Bindung an den Streptavidin-Biotin-Komplex (Negativ-Kontrolle) deutlich.

4.2.2 Hochdurchsatzsequenzierung

Vorbereitend wurden über spezielle Primer (rd1: SiA3Pro3, rd3: SiA5Pro3, und SPro5) Adapter für die Sequenzierung mittels Solexa-Technologie und Markierungssequenzen (Barcodes) für die spätere Zuordnung der Selektionsrunde bei den eluierten und vervielfältigten Oligonukleotiden von Runde 1 und 3 eingefügt. Eine Analyse der gewonnen Sequenzierdaten (ca. 1 Mio. Sequenzen pro Runde) erfolgte zunächst durch Sortieren nach Häufigkeiten der Sequenzen (Liste der Top 20: s. Anhang).

Nach der dritten Selektionsrunde wurden die häufigste (S2R3#1) sowie die zweithäufigste Sequenz (S2R3#2) des Pools ausgewählt und als synthetische Oligonukleotide ohne Primersequenzen (s. Tab. 25) für Bindungsstudien (s. 4.4.2 und 4.4.3) verwendet.

Tab. 25: Mögliche Streptavidin-Aptamere aus der dritten Runde der zweiten Selektion, (Identifiziert mit Hochdurchsatzsequenzierung)

Klon	Sequenz
S2R3#1	5' -GGAGCACGCAACAGGGGTGGAGAATGGTCT
S2R3#2	5' -AACCCCTCATTGACCCCTCCTACATGGCCTGT

Beide Klone sind nicht nur in der dritten, sondern auch in der ersten Selektionsrunde die häufigsten Sequenzen (s. Anhang, Tab. A8). Die bereits in der ersten Streptavidin-SELEX über 10 Runden identifizierte Motive ACGC bzw. CGCA treten im Klon S2R3#1 einmal auf, fehlen jedoch im Klon S2R3#2.

Die aus der Hochdurchsatzsequenzierung gewonnenen Daten waren unvollständig und nicht zufriedenstellend, zumal die zweite Selektionsrunde nicht sequenziert werden konnte. Um den vollständigen Datensatz einer Selektion über drei Runden zu gewinnen und weitere Parameter (Selektionsmatrix, Primerlänge, Aufreinigungsmethode) prüfen zu können wurde daher eine weitere *in vitro*-Selektion von Streptavidin-Aptameren in drei Runden erforderlich (s. 4.3).

4.3 Dritte *in vitro*-Selektion von DNA-Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden

In einer dritten *in vitro*-Selektion von Aptameren gegen das Zielmolekül Streptavidin konnten alle gewonnenen Erkenntnisse vorangegangener SELEX-Experimente zusammengeführt, weitere Parameter getestet und somit der Prozess optimiert werden: Es erfolgten insgesamt vier parallele Selektionen (s. Tab. 26); mit zwei verschiedenen streptavidin-derivatisierten magnetischen Partikeln (Dynabeads[®] M-280 Streptavidin, INVITROGEN[™]/ SiMAG-Streptavidin, CHEMICELL) bzw. je zwei Primersets unterschiedlicher Länge zum Test verschiedener Aufreinigungsmethoden (magnetische Partikel/ Zentrifugationssäulen). Zudem wurden geringere Mengen magnetischer Partikel eingesetzt, die Inkubationszeiten verkürzt und weniger Waschschriffe mit geringeren Volumina durchgeführt (s. Tab. 27). Zur verbesserten Vergleichbarkeit mit den vorangegangenen SELEX-Experimenten entstammen die gezeigten Daten nur den Selektionen mit Dynabeads[®], weitere Daten sind hier nicht dargestellt.

Tab. 26: Durchführung der dritten *in vitro*-Selektion gegen Streptavidin (Durchgeführte aber nicht dargestellte Selektionen sind grau unterlegt)

Selektionsmatrix	Dynabeads [®] M-280 Streptavidin (INVITROGEN [™] , Ø 2,8 µm)		SiMAG-Streptavidin (CHEMICELL, Ø 1 µm)	
Bindungskapazität (Biotin/ mg Beads)	650-900 pmol		60-250 pmol	
verwendete Primer	Pro3/Pro5 (je 18 bp)	T7TPro3/T7Pro5 (je 36 bp)	Pro3/Pro5 (je 18 bp)	T7TPro3/T7Pro5 (je 36 bp)
Oligonukleotidlänge	66 bp	102 bp	66 bp	102 bp
Aufreinigungsmethode	magnetische Partikel (sbeadex [®] , LGC)	Säulen (GeneMatrix, ROBOKLON)	magnetische Partikel (sbeadex [®] , LGC)	Säulen (GeneMatrix, ROBOKLON)

Als initiale Oligonukleotid-Bibliothek wurden 0,5 nmol der Bank30 (ssDNA) verwendet und vor Beginn der Selektion in 550 µl 1× BP denaturiert (94°C für 3 min, anschließend 4°C). Die Parameter der Selektionsrunden sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Die Elution gebundener Sequenzen erfolgte kompetitiv mit 0,5 mM Biotin in 50 µl MilliQ für 6 min bei 60°C. Die gesamte Elutionsfraktion (50 µl) wurde dann als Templat in der anschließenden Amplifikationsreaktion eingesetzt. Eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Primerset Pro3/Pro5 erfolgte durch magnetische Partikel (sbeadex[®], LGC), bei den Proben mit T7-Sequenz mit säulenbasierten GeneMatrix-Kits (ROBOKLON). Für die Selektionsrunden 2 und 3 wurden diese aufgereinigten PCR-Produkte bei 94°C für 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Tab. 27: Übersicht der Parameter für die dritte Selektion von Aptameren gegen Streptavidin in 3 Runden

Runde	Primer	DNA [µg]	ssDNA [pmol]	Streptavidin- Beads [µg]	Inkubations- zeit [min]	Wasch- schritte	PCR-Zyklen
1		10 (ss)	500	500	40	1× 600 µl	24
		10 (ss)	500	500	40	1× 600 µl	24
2	Pro3/ Pro5	1 (ds)	25	300	40	2× 600 µl	30
	T7TPro3/ T7Pro5	1 (ds)	25	300	40	2× 600 µl	20
3	Pro3/ Pro5	0,5 (ds)	12,5	100	40	3× 600 µl	25
	T7TPro3/ T7Pro5	0,5 (ds)	12,5	100	40	3× 600 µl	20

Nach Abschluss der dritten Selektionsrunde wurden über eine PCR mittels geeigneter Primer (PE-Pro3/GiAPro5-GiLPro5) Adapter- und Markierungssequenzen (Barcode) für die anschließende Hochdurchsatzsequenzierung eingefügt.

4.3.2 Hochdurchsatzsequenzierung

Eine Sequenzierung der Selektionsrunden erfolgte mit der *next-generation sequencing*-Technologie Solexa (ILLUMINA) und anschließender Sortierung der Sequenzen nach ihrer Häufigkeit innerhalb des Pools. Für Bindungsstudien wurden häufigere Klone ohne die Primersequenzen als synthetische Oligonukleotide bestellt und getestet (s. Tab. 28). Eine Liste der Top 20 jeder Selektionsrunde befindet sich im Anhang.

Tab. 28: Mögliche Streptavidin-Aptamere aus der dritten Runde der dritten Selektion, identifiziert nach der Hochdurchsatzsequenzierung

Klon	Sequenz
S3PrIR3#1	5'-ACGGCACCGGACATGACACCGTACCTGCTCT
S3PrIR3#3	5'-TCACGCTCAGGTCATGACACCGTACCTGCTCT
S3PrIR3#5	5'-AGCACGCCTGATTCAAAGGCGGTCCCTCTCA
S3PrIR3#7	5'-GGCACGCGCATGACACCGTACCTGCTCT
S3T7IR3#1	5'-ATTCCCATGCCCATGTCGCAATGGTGGGAAC
S3T7IR3#3	5'-GCCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGGCCT
S3T7IR3#5	5'-GCCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGTGC

Von den ausgewählten Klonen lassen sich S3PrIR3#1 und S3PrIR3#5 schon in der zweiten Selektionsrunde unter den Top 10 (Position 4 bzw. 7) nachweisen; weitere Sequenzen fehlen in den Top 100 der ersten zwei Selektionsrunden. Aus der Selektion mit den verlängerten Primersequenzen T7Pro5/T7TPro3 ist Klon S3T7IR3#1 bereits in Runde 1 und 2 der Häufigste. Klon S3T7IR3#3 wird in der zweiten Runde auf Position 13 und Klon S3T7IR3#5 an Position 61 gelistet. Beide befinden sich nicht unter den Top 100 der ersten Runde.

Eine Ermittlung angereicherter (d.h. ggf. bindungsrelevanter Motive) erfolgte mit dem Analyseprogramm MEME [1]. Hierfür wurden die Top 100 der in der Hochdurchsatzsequenzierung ermittelten Sequenzen mit dem Web-Programm analysiert. Die Selektion mit den Primern Pro3/Pro5 ergab keine Motive, die in mehr als 5% der Sequenzen vorkamen. Dagegen ließen sich unter den 100 häufigsten Sequenzen der dritten Selektionsrunde, mit verlängerten Primern (T7TPro3/T7Pro5), einige auffällig angereicherte Motive nachweisen. Diese traten in 20-40% des Pools auf und sind in Abbildung 22 dargestellt.

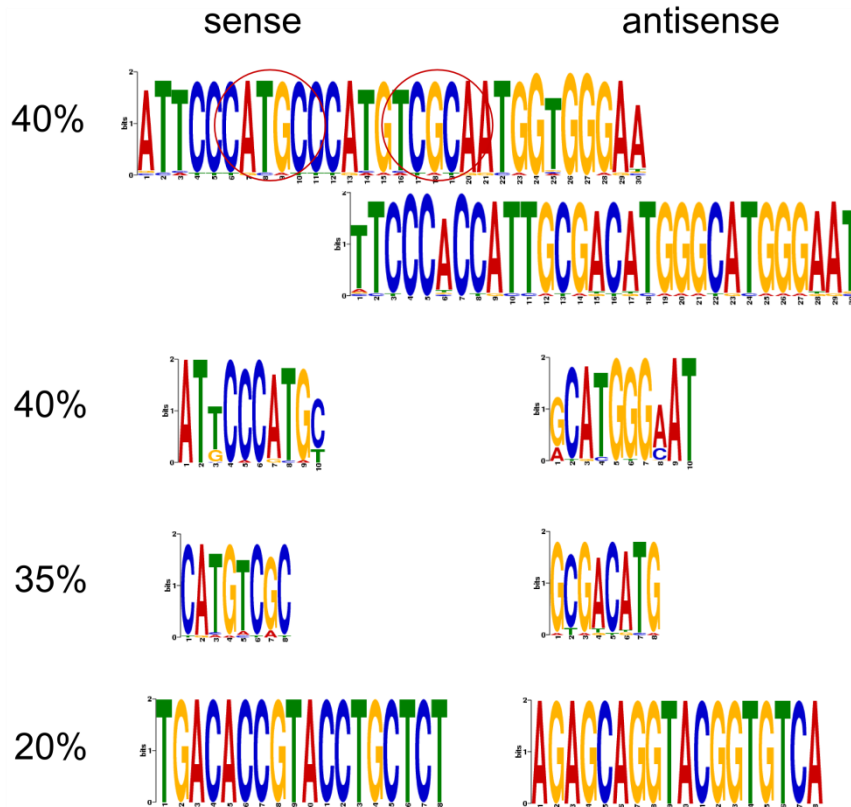


Abb. 22: Angereicherte Motive der dritten Selektionsrunde der dritten Streptavidin-SELEX mit den Primern T7TPro3/T7Pro5. Für die Darstellung der Motive wurden die 100 häufigsten Sequenzen der dritten Selektionsrunde mit dem Analyse-Programm MEME ausgewertet (Parameter: Motivlänge minimal 3, maximal 10 bzw. 30); zudem wurde der Gegenstrang berücksichtigt. Kreismarkierungen kennzeichnen die Motive ATGC bzw. ACGC.

Die angereicherten Motive des Pools der dritten Runde bestehen aus 8 bis 30 Basen und weisen teilweise einen GC-Gehalt von über 50% auf. Zudem enthalten alle Motive Oligo-C bzw. Oligo-G-Bereiche sowie CGC oder GCG. Das in den Klonen der ersten Selektion identifizierte Motiv ACGC tritt nicht mehr auf, dafür jedoch das in einer Base abweichende Motiv ATGC.

4.4 Charakterisierung der Streptavidin-Aptamere

Zur Beurteilung des Aptamer-Selektionserfolges gegen das Zielmolekül Streptavidin wurden ausgewählte Sequenzen ohne Primerregionen chemisch synthetisiert (s. Tab. 21, 23, 25 und 28) und hinsichtlich ihrer möglichen Sekundärstrukturen, Bindungsqualität bzw. Intensität untersucht.

4.4.1 Strukturvorhersagen selektierter Einzelklone

Die Sekundärstrukturen identifizierter Streptavidin-Aptamere aus allen SELEX-Experimenten lassen sich über das Programm *mfold web server* (Version 3.2), dem der Zuker-Algorithmus zugrunde liegt [133], aufklären: Dieses Analyse-Programm berechnet die Faltungsmöglichkeiten

einzelsträngiger Nukleinsäuren durch eine Energie-Minimierungs-Methode unter Berücksichtigung von Haarnadelstrukturen (*Stems*, *Loops*) und Schleifen (*Bulges*). Aussagen über komplexere Tertiärstrukturen, wie z.B. G-Quadruplexe, erlaubt diese Sekundärstrukturanalyse hingegen nicht.

In der Ergebnisdarstellung (s. Abb. 23) sind die berechneten Sekundärstrukturen einiger Aptamere gezeigt. Die Sequenzen wurden sowohl mit Primerregionen, wie in den Bindungsstudien verwendet, also auch ohne, wie sie in der Selektion wie auch ohne gewählt (Abb. 23). Weitere befinden sich im Anhang. Die Parameter für die Berechnungen richteten sich nach den Selektionsbedingungen (Ionenkonzentrationen wie in 1× BP; RT).

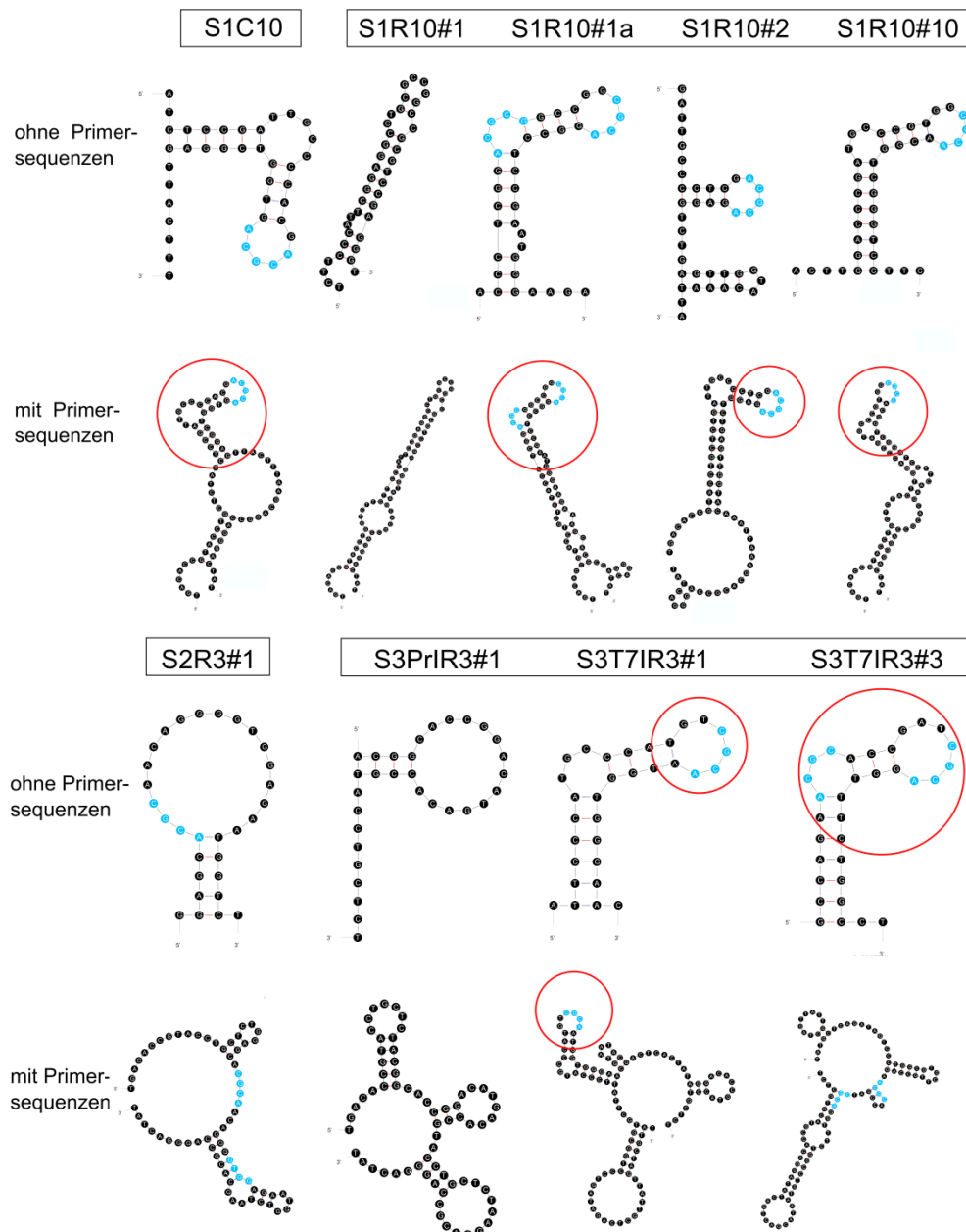


Abb. 23: Sekundärstrukturvorhersagen ausgewählter Streptavidin-Aptamere. Von den über das Analyseprogramm *mfold* generierten Vorhersagen der Streptavidin-Aptamere mit oder ohne Primerregion wurden jeweils die energieärmsten Sekundärstrukturen ausgewählt. Das in den Klonen der Hochdurchsatzsequenzierung identifizierte Motiv AC GC ist blau markiert.

Viele der selektierten Aptamere weisen nicht nur eine ausgeprägte, sondern zudem auch eine bemerkenswert ähnliche Struktur (zwei hintereinander liegende Haarnadelstrukturen) auf. Sie zeigen eine doppelsträngige Stamm- und eine einzelsträngige Schleifenregion, die das zuvor identifizierte Motiv ACGC (5' → 3' und 3' → 5', in Abb. 23 blau unterlegt) enthält. Stammbildende Basenpaare bestehen überdurchschnittlich häufig aus Guanin und Cytosin. Vermutlich können sich G-Quadruplexen ausbilden. Eine präzise Analyse der Sekundärstruktur ist jedoch auf diesem Wege für eine genauere Beurteilung nicht möglich.

Die mithilfe des Zuker-Algorithmus berechneten freien Energien der Faltungen (ca. zwischen -1 und -10 kcal/mol) unterliegen starken Schwankungen, die auf einer unterschiedlichen Anzahl von intramolekularen Hybridisierungen beruhen – die Länge der doppelsträngig organisierten Bereiche tragen zu einer Verringerung der freien Energie bei.

Weitere berechnete Sekundärstrukturen sowie die entsprechenden freien Enthalpien ihrer Faltungen (mit und ohne Primersequenzen) sind für alle untersuchten Aptamere im Anhang dargestellt.

4.4.2 Qualitative Bindungsstudien selektierter Streptavidinaptamere

Die Funktionalität der identifizierten Aptamersequenzen (ausgewählte Klone der Selektionen) wurden im Mikrotiterplatten-Bindungsassay hinsichtlich ihrer Bindungsqualität an das Zielmolekül Streptavidin untersucht (s. Abb. 24a und b). Als Kontrolle dienten Kavitäten, in denen das Zielmolekül in komplexer Verbindung mit Biotin vorlag (d.h. die Bindungstasche ist belegt) sowie eine Sequenz ähnlicher Länge (Kontroll-Oligo), die nicht aus einem SELEX-Experiment stammte.

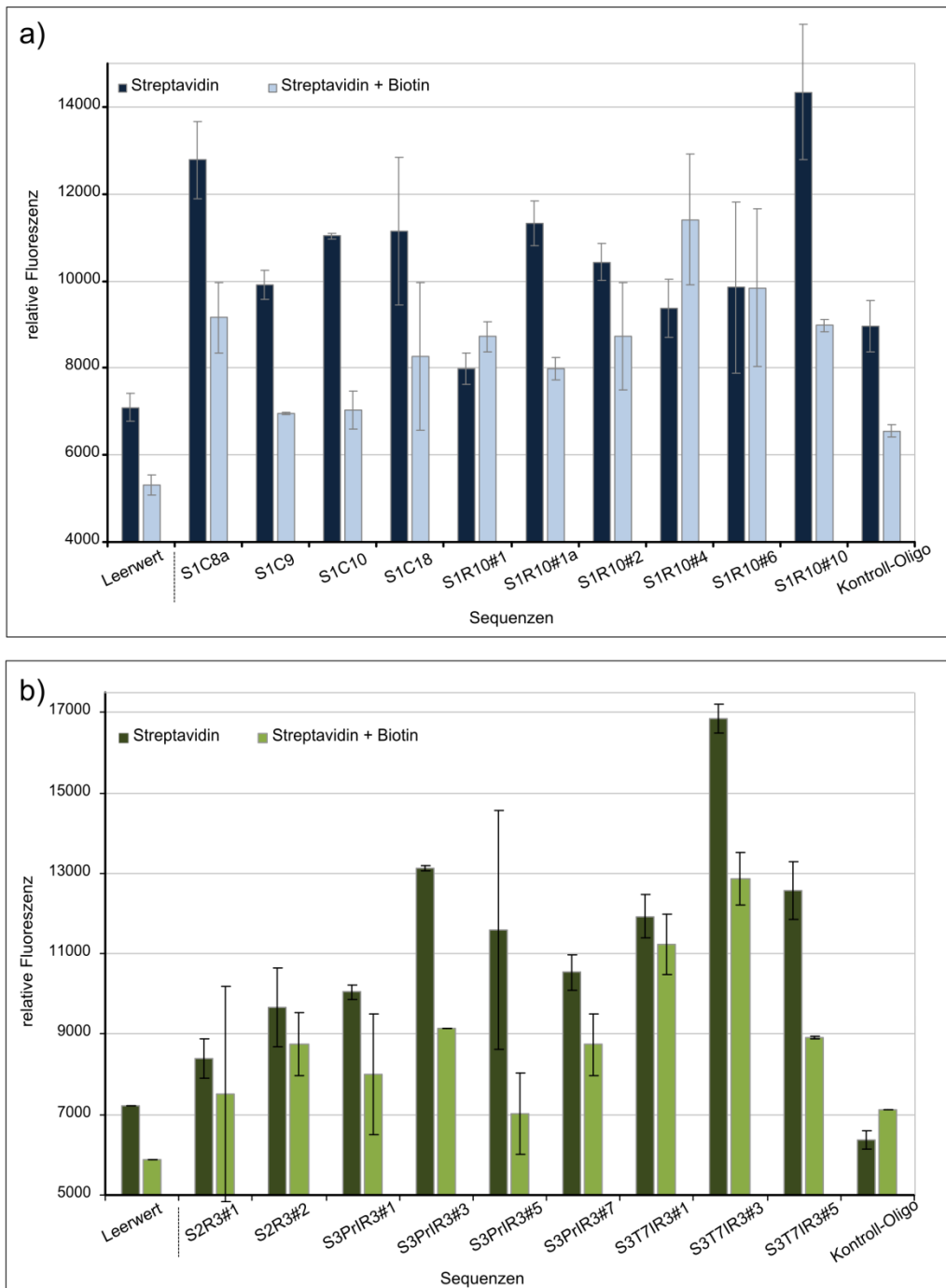


Abb. 24a/b: Vergleich des Bindungsvermögens der selektierten Sequenzen mittels FLAA; a) 40mere aus der 10-Runden-SELEX, b) 30mere aus Selektionen in 3 Runden. ssDNA der identifizierten Einzelklone wurde in den Kavitäten einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Der einzelstrangbindende Farbstoff OliGreen® detektiert gebundene Nukleinsäuren. Als Kontrolle dienen Kavitäten mit einem Streptavidin-Biotin-Komplex sowie eine Sequenz ähnlicher Länge, die nicht aus den Selektionen stammte. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzen der Einzelklone.

Für alle getesteten Klone sowie das Kontroll-Oligo konnte mit dieser Bindungsstudie eine hohe Affinität für Streptavidin nachgewiesen werden. Gleichzeitig war eine gesteigerte Affinität mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex feststellbar. Als „positive Binder“ wurden mit dieser Versuchsanordnung nur Aptamere mit einem, gegenüber den restlichen Sequenzen auffällig gesteigertem Signal charakterisiert.

4.4.3 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bestimmung der qualitativen Bindung bzw. Affinität der selektierten Aptamere zum Zielmolekül Streptavidin erfolgte mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) am BIACore™-X-Gerät.

Auf kommerziell erhältlichen Streptavidin-Chips ist das Zielmolekül zumeist in hohen Dichten auf der Oberfläche immobilisiert, d.h. gebundene Nukleinsäuren könnten nach der Dissoziation vom Zielmolekül sofort eine erneute Bindung eingehen. Dieser Umstand erschwert die getrennte Bestimmung von Assoziation und Dissoziation, daher wurde Streptavidin für Bindungsstudien kovalent und in einer geringen Dichte an die Carboxylgruppen eines Chips (CM5, BIACORE®) immobilisiert; die Aptamere wurden nachfolgend mit einer Flussrate von 30 µl/min in 1× BP injiziert.

Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) an das Zielmolekül erfolgte für das Aptamer S1C10 mit Messungen verschiedener Konzentrationen (0,1 bis 2 µM) und einer Injektion von jeweils 30 µl zuvor denaturierter und auf RT abgekühlter Aptamer-Lösung (s. Abb. 25). Assoziation und Dissoziation an das Zielmolekül konnten durch den Anstieg des Messsignals (RU) und dessen Abfall verfolgt werden. Als Referenz diente ein Kanal, dessen Oberfläche mit Ethanolamin geblockt war. Von der Messkurve wurde die Referenzkurve (Kanal ohne Zielmolekül) für die Auswertung abgezogen. Weiterhin wurde auch das Signal nach Injektion von Bindungspuffer von den Messkurven subtrahiert.

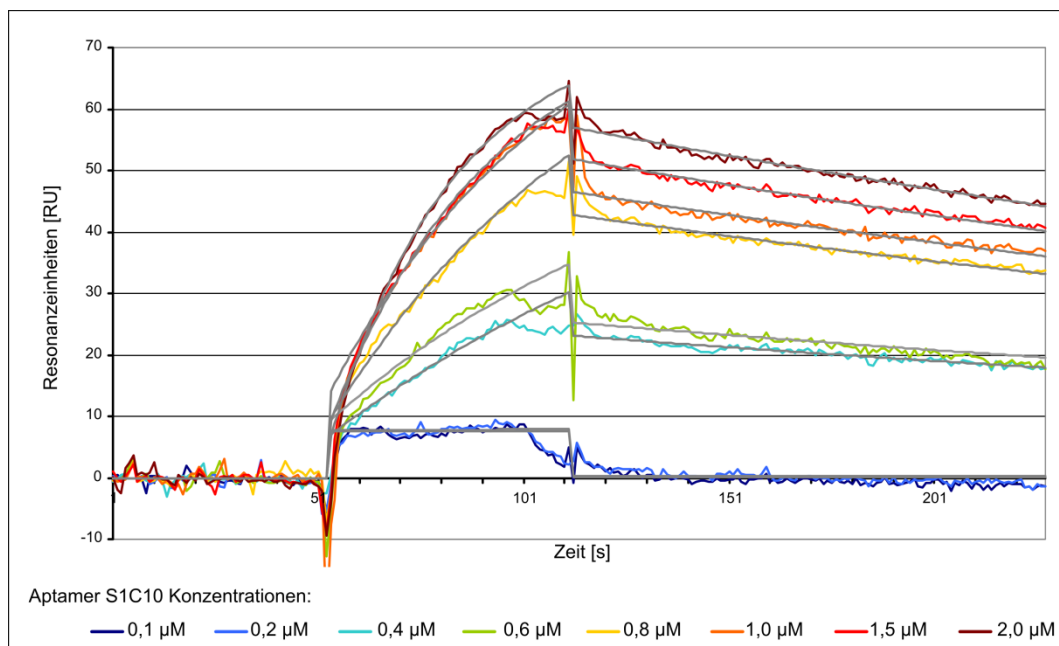


Abb. 25: Oberflächenplasmonresonanz-Sensorgramm für die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) des Aptamers S1C10. Streptavidin wurde kovalent auf einen CM5-Chip immobilisiert (900 RU) und verschiedene Konzentrationen (0,1–2 µM) des Aptamers S1C10 injiziert. Die Auswertung erfolgte durch Subtraktion des Referenzkanalsignals und Anpassung nach dem 1:1-Langmuir-Bindungsmodell.

Der „Fit“ (die Anpassung) erfolgte mithilfe der BIAevaluation Software (Version 4.1) nach dem Langmuir 1:1 Bindungsmodell. Die ermittelte Assoziationsrate (K_{on}) betrug $1,5 \times 10^4 \times M^{-1} \times s^{-1}$, die Dissoziationsrate (K_{off}) $2,2 \times 10^{-3} \times s^{-1}$. Die berechnete Dissoziationskonstante (K_D) für das Aptamer S1C10 beträgt 140 nM, der Chi-Quadrat-Wert (χ^2) liegt bei 0,535.

Eine qualitative Beurteilung der Bindung, d.h. ein Vergleich aller Aptamere bzw. identifizierter potenzieller Binder, erfolgte auf einem weiteren CM5-Chip, auf dem ca. 7000 RU Streptavidin kovalent immobilisiert waren. Für diese Messungen wurden 30 μ l einer 1 μ M-Lösung bei einer Flussrate von 30 μ l/min injiziert. Der Signalanstieg im Differenzsensorgramm (Messkurve abzüglich der Referenzkurve) erreichte Werte zwischen 80 und 350 RU. Getestet wurden 40mere der 10-Runden-SELEX (4.1) gegen Streptavidin (s. Abb. 26a) und die 30mere aus den Selektionen in 3 Runden (4.2 und 4.3) (s. Abb. 26b).

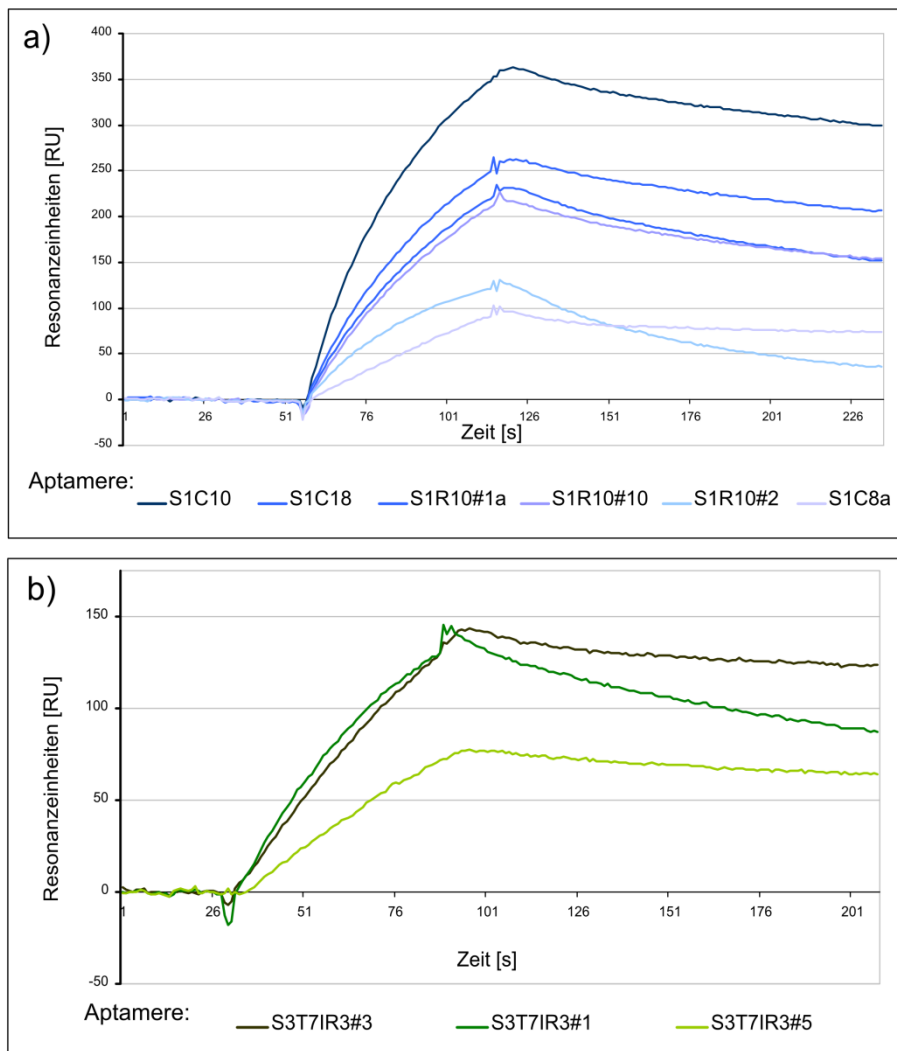


Abb. 26: Oberflächenplasmonresonanz-Sensorgramme für a) 40mere der 10-Runden-SELEX und b) 30mere der 3-Runden-SELEX. Aptamere (1 μ M) wurden auf einen mit Streptavidin kovalent immobilisierten CM5-Chip (7000 RU) injiziert. Die Auswertung erfolgte durch Subtraktion des Referenzkanalsignals.

Eine Auswertung erfolgte analog der Bestimmung der Dissoziationskonstante. Die Daten der SPR-Messungen bestätigten die in FLAA-Experimenten beobachtete hohe Affinität für die 40 N-Aptamere S1C10, S1C18, S1R10#1a und S1R10#10 an Streptavidin sowie das schwächere Bindungsverhalten der Sequenzen S1R10#2 und S1C8a. Die Klone S1R10#1, S1R10#4, S1R10#6 und S1C9 (in Abb. 25 nicht dargestellt) zeigten keine Bindung an das Zielmolekül Streptavidin. Aus den 3-Schritt-Selektionen gingen die 30 N-Aptamere S3T7IR3#3 und S3T7IR3#1 mit hoher Affinität bzw. S3T7IR3#5 mit einer mäßigen starken Bindung an das Zielmolekül hervor. Alle weiteren getesteten Sequenzen zeigten keine Bindung an Streptavidin.

Da eine Dissoziationskonstante (K_D) nur für den Klon S1C10 (40mer) ermittelt wurde, nicht aber für eines der selektierten 30mere aus der 3-Schritt-SELEX, sollte über eine faktorielle (Längen-) Korrektur der 30mer-Sensorgramme die Affinität abgeschätzt bzw. verglichen werden (s. Abb. 27).

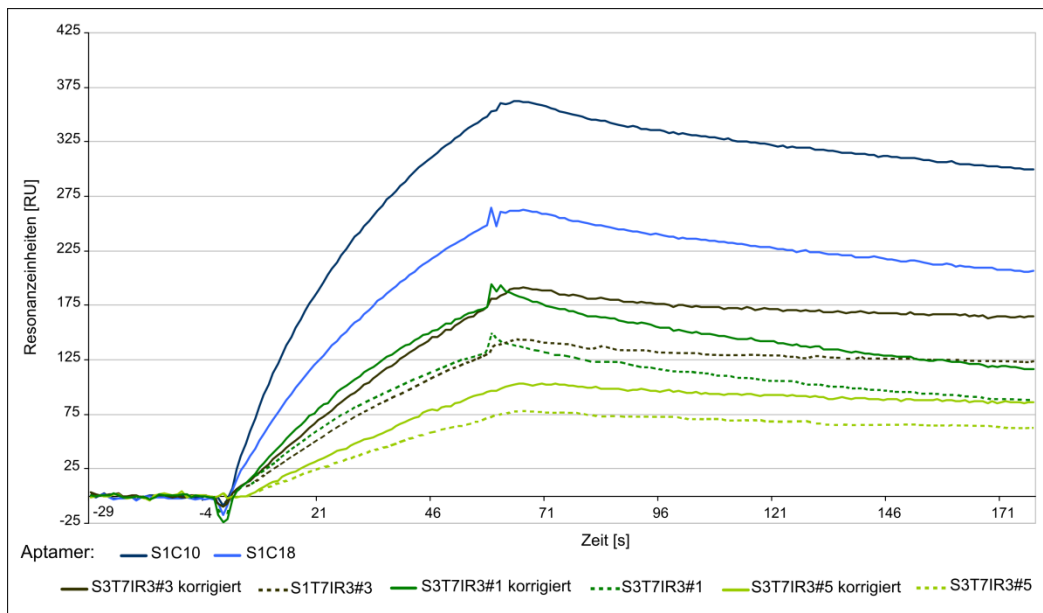


Abb. 27: Oberflächenplasmonresonanz-Sensorgramme der 40mere aus der 10-Runden-SELEX (blau) und der 30mere aus der 3-Runden-SELEX (grün). Eine Korrektur bzw. Anpassung auf die Oligonukleotidlänge der Kurven wurde durch die folgende Berechnung: $x/3*4$ durchgeführt.

4.5 Anwendungen von Streptavidin-Aptameren

Aptamere lassen sich, vergleichbar mit Proteinen oder Antikörpern, in vielen Bereichen der Biotechnologie einsetzen. Als eine mögliche Applikation wurde die aptamerbasierte Affinitätschromatographie mit magnetischen Partikeln unter dabei vorherrschenden Bedingungen getestet.

Diese Experimente erfolgten bereits nach Abschluss der zweiten Streptavidin-SELEX; daher wurden exemplarisch die Sequenzen S1C18 (40 N) aus der ersten (s. 4.1) sowie S2R3#1 (30 N) aus der zweiten Streptavidin-Aptamer-Selektion (s. 4.2.2) – zunächst ohne Kenntnis der Dissoziationsskonstanten – ausgewählt.

4.5.1 Nachweis der kovalenten Immobilisierung der Streptavidin-Aptamere auf magnetischen Partikeln

Die selektierten Streptavidin-Aptamere S1C18 und S2R3#1 wurden für weitere Bindungsstudien und biotechnologische Applikationen kovalent auf der carboxylierten Oberfläche magnetischer Partikel (SiMAG, Carboxyloberfläche, CHEMICELL) immobilisiert.

Mithilfe des einzelstrangbindenden Farbstoffs OliGreen® (1:10000 in PBS-T) wird die kovalente Immobilisierung der ssDNA an die magnetischen Partikel nachgewiesen: Dies erfolgt eine 15-minütige Inkubation mit dem Farbstoff, bei RT, in Dunkelheit und einem kurzen Waschschriff mit PBS-T, bevor 5 µl der Partikellösung zum Trocknen auf einen Objektträger gegeben werden. Die fotografische Aufnahme des Objektträgers entstand bei 473 nm (FUJIFILM, FLA-8000), das Ergebnis zeigt Abbildung 28.

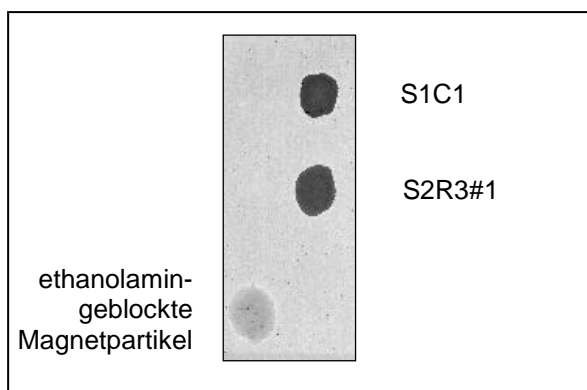


Abb. 28: Nachweis der kovalenten Immobilisierung von Aptamersequenzen (S1C10 und S2R3#1) auf der Oberfläche magnetischer Partikel, mit dem einzelstrangbindenden Farbstoff OliGreen®.

4.5.2 Magnetpartikel-ELISA

Die Faltung von Nucleinsäuren ist hochgradig von der umgebenen Ionenkonzentration sowie der An-/Abwesenheit destabilisierender Faktoren (z.B. Nucleasen) abhängig. In wie weit die Funktionalität, d.h. das Bindungsvermögen der selektierten Aptamersequenzen, nach der Immobilisierung auf magnetischen Partikeln und in einem Zelllysate-haltigen Puffer beeinträchtigt wird, kann durch einen Magnetpartikel-ELISA aufgeklärt werden.

Hierzu wurden 5 µl magnetische Partikel, auf denen zuvor ssDNA kovalent immobilisiert worden ist (s. 2.5.1) mit 200 µl 1x BP/Zelllysate (BL21) (Verhältnis 1:2) mit Streptavidin-HRP (1:4000) bzw.

Streptavidin-HRP+Biotin (1:4000 + 0,1 nM Biotin) als Kontrolle und 0,1% BSA für 30 min bei RT inkubiert.

Als weitere Kontrolle, zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung von Streptavidin-HRP an Magnetpartikel mit immobilisierter Nukleinsäure, dienten Partikel mit aufgebrachtem Kontroll-Oligo ähnlicher Länge, das nicht aus einem SELEX-Experiment stammte.

Nach einem Waschschriff mit 200 µl 1x BP wurde die Substratlösung (ABTS) für 20 min zugegeben. Durch Separation der magnetischen Partikel konnte die Substratlösung in eine neue Kavität überführt und so die enzymatische Reaktion gestoppt werden. Die anschließende Messung der Absorptionen erfolgte bei 405 nm (s. Abb. 29).

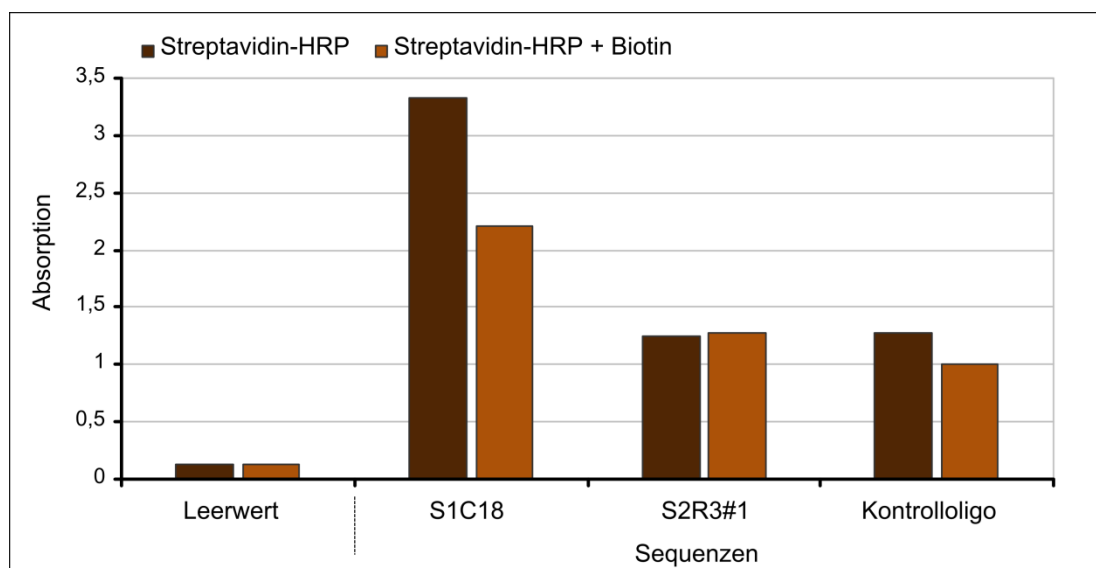


Abb. 29: Vergleich der Bindungsqualitäten immobilisierter Streptavidin-Aptamere auf magnetischen Partikeln. Die an magnetische Partikel kovalent gebundenen Streptavidin-Aptamere S1C18, S2R3#1 sowie ein Kontroll-Oligo wurden in zelllysathaltigem Puffer mit Streptavidin-HRP inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte durch Absorptionsmessung, nach Umsetzung des Substrats ABTS.

Für das immobilisierte Streptavidin-Aptamer S1C18 konnte, verglichen mit Aptamer S2R3#1 und der Kontroll-Sequenz gleicher Länge, eine deutlich höhere Substratumsetzung – d.h. eine quantitativ höhere Bindung an Streptavidin – nachgewiesen werden. Bei einer Inkuabtion in Gegenwart Biotin war hingegen der Substratumsatz vermindert.

4.5.3 Aptamerbasierte Affinitätschromatographie von Streptavidin-Fusions-Protein aus Zelllysate

Die Affinitätschromatographie von rekombinant hergestelltem Streptavidin, als auch eines Fusionsproteins wurde immobilisierten Aptameren (S1C18 und S2R3#1) unter realistischen Bedingungen getestet.

Zur Expression des rekombinanten Fusionsproteins MBP-SA (*maltose binding protein-streptavidin*) sowie des Streptavidins (SA) wurde das pET-Vektor-System (*plasmid expression by T7-RNA-Polymerase*; NOVAGEN[®]) ausgewählt. Dieses Expressionssystem aus dem Bakteriophagen T7 zeichnet sich durch eine besonders hohe Transkriptionseffizienz aus. Durch seine starken Promotoren, die von der phageneigenen T7-RNA-Polymerase erkannt werden, tritt es erfolgreich mit der Transkriptionsmaschinerie des Wirtes in Konkurrenz [109].

Die bereits klonierten Vektoren pET-15b-MBP-SA und pET-21a-SA wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hans Peter Sørensen (Universität Aarhus, Dänemark) überlassen.

Eine Expression von rekombinatem Streptavidin ist außerhalb von Einschlusskörperchen im Zytoplasma von *E. coli* problembehaftet [101]; durch die N-terminale Fusion des löslichen Chaperons MBP an Streptavidin kann allerdings dessen korrekte Faltung und damit die Ausbeute begünstigt werden [52].

Die Transformation der elektrokompenten BL21(DE3)-*E. coli*-Zellen mit den Vektoren pET-15b-MBP-SA und pET-21a-SA erfolgte mittels Elektroporation. Nach Inkubation bei 30°C über Nacht wurde die Überexpression des rekombinanten Proteins durch 0,5 mM IPTG induziert. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Zellyse und die anschließende elektrophoretische Auftrennung (s. Abb. 30).

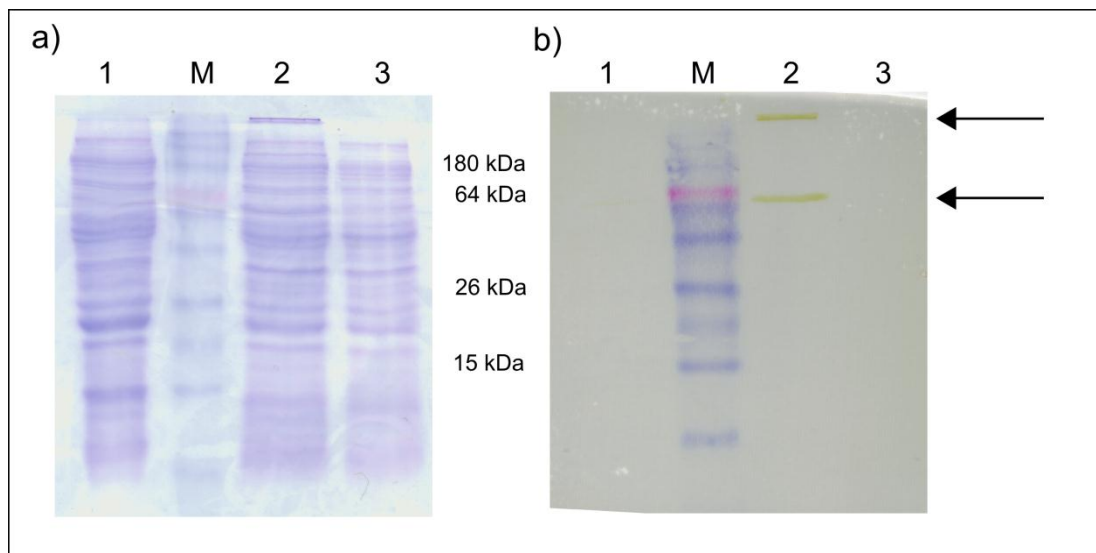


Abb. 30: Nachweis der Expression von MBP-SA im Zellysat pET-15b-MBP-SA-transformierter *E. coli*-Zellen a) im Coomassie gefärbten PAA-Gel (15%); b) im Western Blot mittels Biotin-HRP. Das Zellysat von pET-15b-MBP-SA-transformierten BL21-Zellen mit Induktion durch IPTG (Spur 2), ohne Induktion (Spur 3) sowie aus untransformierten BL21-*E. coli*-Zellen (Spur 1) wurde auf einem 15%igen PAA-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie-gefärbt. Im Western Blot konnten nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran die rekombinanten Proteine mithilfe von Biotin-HRP und dem dadurch umgesetzten Substrat CN/DAB detektiert werden. Der Pfeil zeigt die Banden des Fusionsproteins MBP-SA (ca. 230 kDa) und des Streptavidins (67 kDa).

Für die Aptamer-basierte Affinitätschromatographie des Fusionsproteins MBP-SA wurden die zuvor getesteten Magnetpartikel (s. 4.5.2) mit den immobilisierten Aptamersequenzen S1C18 und S2R3#1 verwendet. Magnetpartikel mit einem Kontroll-Oligo ähnlicher Sequenzlänge dienten als Negativ-Kontrolle. Eine unspezifische Bindung des Proteins an Nukleinsäuren war nicht zu beobachten. Das Ausgangsmaterial und die einzelnen Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden für den Zielprotein-Nachweis elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 31).

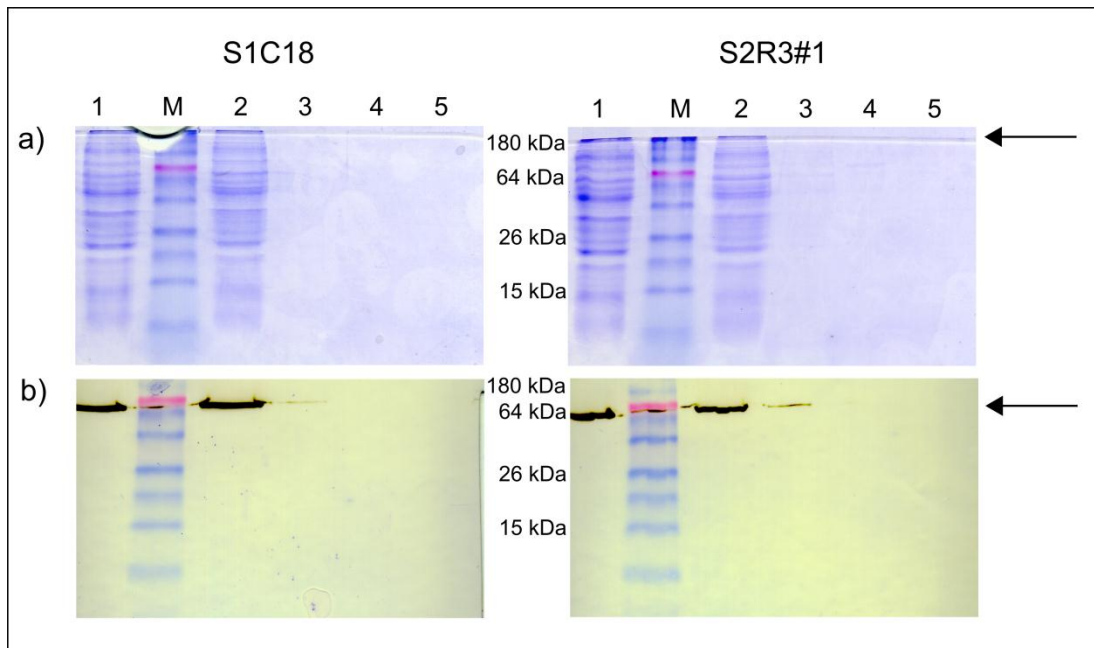


Abb. 31: Nachweis des Zielproteins MBP-SA in den Fraktionen der Affinitätschromatographie
a) im Coomassie gefärbten PAA-Gel (15%); b) im Western Blot mit Biotin-HRP. Das Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie (Spur 1: Zelllysats aus pET-15b-MBP-SA-transformierten *E. coli*-Zellen, 1:2 mit BP verdünnt) wurde mit magnetischen Partikeln, auf deren Oberfläche die Steptavidin-Aptamere S1C18 und S2R3#1 immobilisiert waren, inkubiert. Der Überstand (Spur 2) wurde abgenommen und die Beads mit BP gewaschen (Spur 3). Für die Elution des Zielproteins wurde 10% Methylpyrrolidone (Spur 4) verwendet, anschließend 10% SDS (Spur 5).

Die ursprünglich im Western Blot des Zelllysats detektierte erste Bande bei 230 kDa wurde in den Experimenten zur Aufreinigung von MBP-SA nicht mehr festgestellt. Eine Bande bei 64 kDa trat hingegen sowohl im Ausgangsmaterial (Spur 1: Zelllysats aus pET-15b-MBP-SA transformierten Zellen) als auch im Überstand nach der Inkubation mit Streptavidin-Aptamer-Beads (Spur 2) auf. In den Waschfraktionen (Spur 3 und 4) und der Elution (Spur 5) ließ sich kein Protein nachweisen.

4.6 Amplifikationsreaktionen in Emulsionen

Während eines SELEX-Prozesses mit 10 Selektionsrunden können bis zu 200 PCR-Zyklen durchlaufen werden. Aber gerade die Vervielfältigung hochkomplexer Oligonukleotid-Banken, wie sie u.a. für die Selektion von Aptameren eingesetzt wird, birgt ein hohes Risiko für die Ansammlung von Artefakten, wie Rekombination homologer Regionen und bzw. oder Überamplifikation einzelner besonders rasch replizierender kurzer Sequenzen [96]. Diese Artefakte veranschaulicht die Ergebnisdarstellung im Agarosegel, verglichen mit der schärferen Abbildung einer Emulsions-PCR (s. Abb. 32). Zudem ist bei der Amplifikation hochdiverser Pools davon auszugehen, dass nach einem Denaturierungsschritt komplementäre Stränge nicht wieder vollständig hybridisieren, d.h. möglicherweise Heteroduplexe bzw. Falschpaarungen entstehen, welche ebenfalls ein anderes Wanderverhalten im nativen Agarosegel aufweisen.

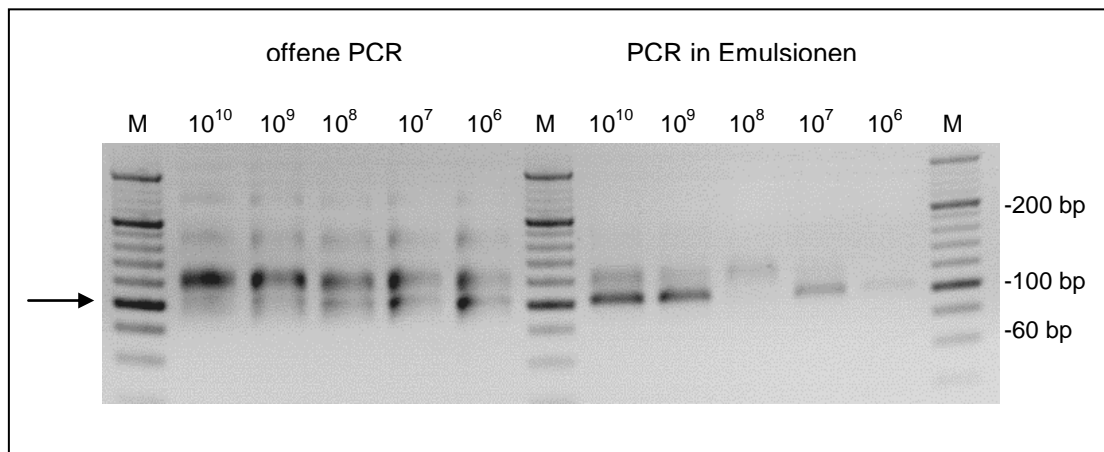


Abb. 32: PCR-Produkte und Artefakte aus offener und geschlossener (emulgierter) Amplifikationsreaktion bei Einsatz unterschiedlicher Anzahlen synthetischer DNA-Banken-Moleküle als Templat. Im Gegensatz zur Emulsions-PCR treten bei einer offenen PCR deutlich mehr Artefakte auf; hier dargestellt in einem 3%igem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Der Pfeil markiert gewünschte Länge der PCR-Produkte (100 bp).

Eine Kompartimentierung der Amplifikationsreaktion, wie bei der PCR in Emulsionen (Wasser-in-Öl-Tropfchen), kann die genannten, und im Agarosegel nachgewiesenen Artefakte größtenteils verhindern helfen (s. Abb. 33).

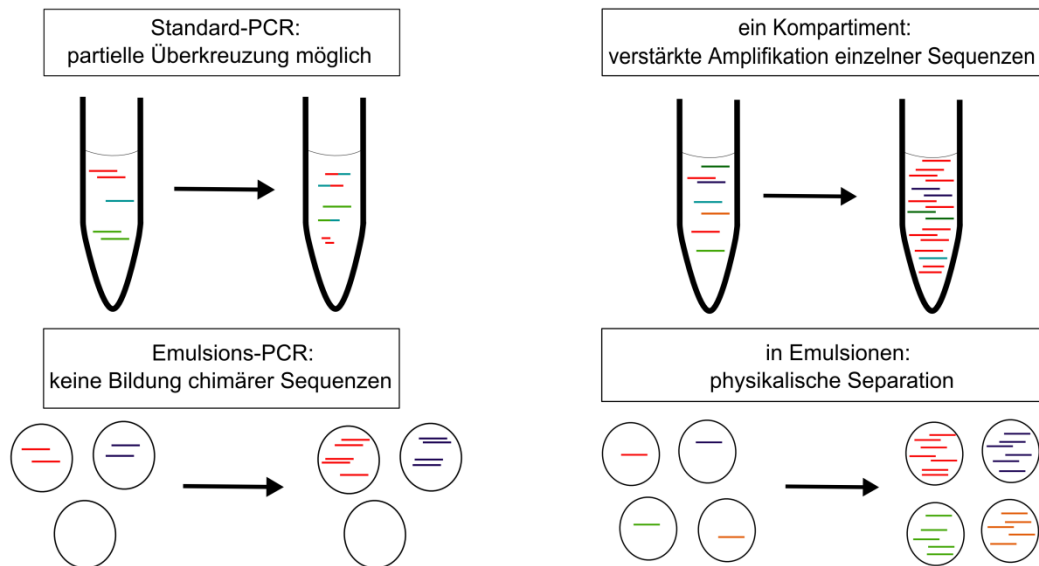


Abb. 33: mögliche Artefakte einer Amplifikationsreaktion a) Bei einer Amplifikationsreaktion in Emulsionen (Kompartimentierung) wird die partielle Überkreuzung homologer Bereiche – und damit die Bildung chimärer Sequenzen – verhindert. b) Die physikalische Separation der Matrizen-DNA während der PCR verhindert die verstärkte Amplifikation einzelner Sequenzen („run-off-amplification“).

4.7 RNA-SELEX gegen kleine Moleküle bzw. Monoamine

Für eine halbautomatisierte Selektion von RNA-Aptameren wurden die Zielmoleküle Dopamin, Serotonin, Histamin und Norepinephrin ausgewählt; diese sind als Neurotransmitter und Hormone für das molekulare Verständnis vieler Erkrankungen von Bedeutung.

Die in diesem Experiment initial eingesetzte, doppelsträngige Oligonukleotid-Bank QST40 – ein PCR-Produkt mit den Primern T7QF/QR besitzt eine randomisierte Region von 40 Nukleotiden, flankiert von Primersequenzen mit T7-Promotor. Mittels *in vitro*-Transkription wurde die QST40-Bank vor Beginn der Selektion in RNA umgeschrieben und mit magnetischen Partikeln (sbeadex[®]) aufgereinigt. Die Parameter der Selektion zeigt Tabelle 29.

Die Zielmoleküle befanden sich kovalent gekoppelt auf magnetischen Partikeln (SiMAG, Carboxyoberfläche, CHEMICELL). Für die erste Selektionsrunde wurden 5 µg der RNA-QST40-Bank mit diesen magnetischen Partikeln inkubiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die RNA-Amplifikation mithilfe der Q β -Replikase mit 40 µl der Elutionsfraktion (50 µl) in Emulsionen. Weitere 10 µl wurden als Rücklage bei -80°C gelagert. Die anschließende Aufreinigung wurde mit magnetischen Partikeln (sbeadex[®]) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tab. 29: Parameter der RNA-Aptamer-Selektion gegen die Zielmoleküle Dopamin, Serotonin, Histamin und Norepinephrin

Runde	ssRNA	Beads [µl]	Beads [µg]	Target [µmol]	Inkubationszeit [min]	Waschschritte	Amplifikation [min]
1	5 µg (120 pmol)	50	2500	1,25	40	2× 600 µl	180
2		30	1500	0,75	40	3× 600 µl	180
3		20	1000	0,5	40	4× 600 µl	180

Im Elutionspuffer des (zur Aufreinigung amplifizierter RNA) verwendeten Kits sind Substanzen enthalten, die keine exakte photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren zuließen. Daher wurden, bis auf o.g. Reserve, die restlichen 40 µl aus Elutionsfraktion (ohne genaue Kenntnis der enthaltenden RNA-Menge) für die nächste Selektionsrunde verwendet.

Nach Abschluss der dritten Selektionsrunde erfolgte eine reverse Transkription mit Taq-Polymerase (Primer: QR/DF5) in Emulsionen der zuvor mit Qβ-Replikase amplifizierten RNA für die Sequenzierung mittels Solexa-Technologie. In einer weiteren PCR wurden über die Primer (GiAQ5 bis GiFQ5 sowie PEQ3) die für die Sequenzierung benötigten Adapter und Barcode-Sequenzen eingefügt.

Wie in den vorangegangenen Selektionen erfolgte die Auswertung der gewonnenen Daten durch Sortieren nach Häufigkeiten (zur Auflistung der 20 häufigsten Sequenzen der dritten Selektionsrunde s. Anhang). Für Bindungsstudien wurden jeweils die zwei häufigsten Sequenzen des Pools ausgewählt und für die *in vitro*-Transkription mit den flankierenden Primerregionen + T7-Promotor als DNA-Matrize synthetisiert (s. Anhang, Tab. A12).

Für die Synthese der RNA-Aptamere wurden aus den einzelsträngigen DNA-Matrizen (s. Anhang Tab. A12) in einer PCR mit zwei Zyklen (Annealingtemperatur = 50°C) dsDNA generiert und dann das aufgereinigte Produkt für die *in vitro*-Transkription eingesetzt.

4.7.1 Nachweis der RNA-Aptamer-Bindung an Monoamin-Dimethylcasein (DMC)

Zur Messung des Bindungsvermögens dieser selektierten RNA-Aptamere wurde ein modifizierter Mikrotiterplatten-Bindungsassay verwendet: Immobilisiertes Monoamin-Dimethylcasein (DMC) (mit Serotonin, Histamin, Dopamin oder Norepinephrin) wird mit dem jeweils spezifischen RNA-Aptameren Ser1, His1, Dop1 und Nor1 inkubiert. Anschließend kann der Anstieg der relativen Fluoreszenz, nach Zugabe von Qβ-Replikase zur isothermalen Amplifikation, gemessen werden. Diese Zunahme im Vergleich zur Ausgangs-Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 (=100%) ist in Abbildung 34 dargestellt.

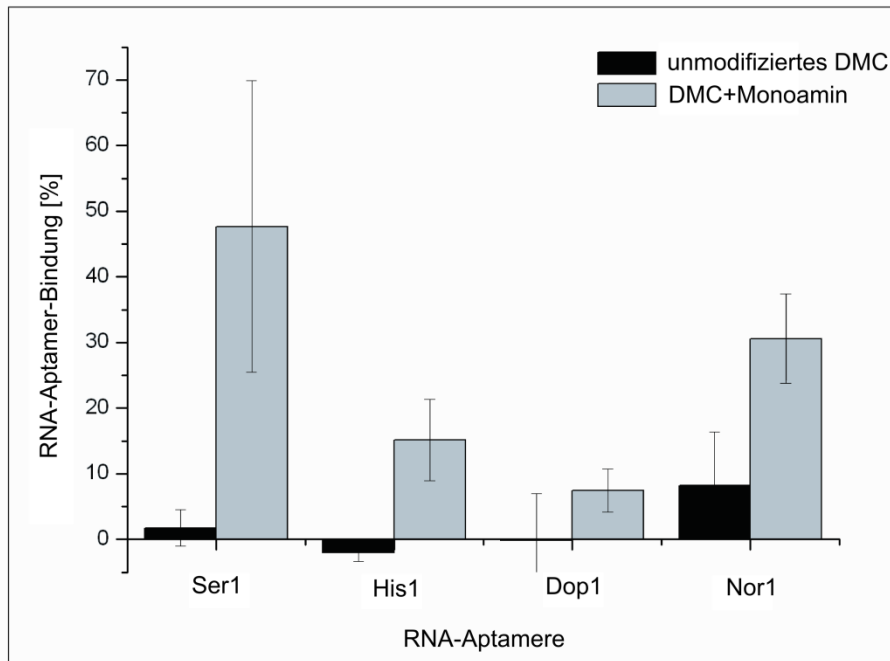


Abb. 34: Zunahme der relativen Fluoreszenz gegenüber dem gemessenen Ausgangswert (in Prozent) durch die Amplifikation der an DMC bzw. Monoamin-DMC gebundenen RNA-Aptamer-Sequenzen

Für alle getesteten RNA-Aptamer-Sequenzen lässt sich eine spezifische Bindung an das — jeweils mit dem Zielmolekül amylierte — DMC feststellen; gleichzeitig ist die Bindung an unmodifiziertes DMC ausgesprochen gering. Es kann folglich von einer hohen Target-Spezifität der Nukleinsäuren ausgegangen werden.

5. Diskussion

Der SELEX-Prozess zur *in vitro*-Selektion funktioneller Nukleinsäuren, wie Aptamere, ist auch 20 Jahre nach seiner Einführung [114] ein zeit- und damit kostenaufwendiges Verfahren geblieben. Zudem mangelt es an einheitlichen Protokollen oder standardisiert durchführbaren Verfahren zur Erreichung einer höheren Erfolgsquote. Im Fokus dieses Forschungsprojekts standen daher eine grundlegende Analyse des SELEX-Prozesses, die Entwicklung einer neuen Methode zur Beurteilung des Selektionserfolgs sowie die Optimierung des Verfahrens unter Einbeziehung moderner Sequenziertechnologien.

5.1 In vitro-Selektionen von DNA-Aptameren

Alle SELEX-Experimente wurden halbautomatisiert mit dem Magnetpartikelprozessor KingFisher Flex durchgeführt. Dieses Gerät transferiert in jedem Schritt die Partikelsuspension in ein neues Gefäß. Aerosolbildungen wie sie bei Ein-Reaktionsgefäß-Verfahren auftreten oder Akkumulation von Plastikbindern, die die Population target-bindener Sequenzen überwachsen, können damit vermindert werden [27]. Außerdem ermöglicht der KingFisher Flex den Einsatz von Mikrotiterplatten, d.h. die parallele Durchführung von bis zu 96 Selektionen unter reproduzierbaren Bedingungen, zugleich bleibt eine größtmögliche Flexibilität erhalten [33].

Eine RNA-Amplifikation während des SELEX-Prozesses erfolgt über die *in vitro*-Transkription, eine PCR und reverse Transkription [23]. DNA hingegen lässt sich mit einer einzelnen Reaktion (PCR) vervielfältigen und besitzt zugleich eine höhere Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen. Daher wurden gegen das Zielmolekül Streptavidin DNA-Aptamere selektiert. Deren höhere Beständigkeit (keine kostenaufwendigen Modifikationen) ist auch im Hinblick auf mögliche biotechnologische Anwendungen wie die Affinitätschromatographie, von Vorteil.

Die gewählte Selektionsmatrix bestand aus streptavidin-derivatisierten magnetischen Partikeln (Dynabeads®), die sich ausgezeichnet für Automatisierungen eignen [128] und nur geringe Volumina für die einzelnen Selektionsschritten erfordern [60]. Auf eine generell notwendige Gegenselektion zum Entfernen von „Matrix-Bindern“ [106] konnte bei diesen SELEX-Experimenten verzichtet werden – das Zielmolekül Streptavidin befindet sich bei den kommerziell erworbenen Magnetpartikeln in einer hohen Dichte auf der Oberfläche. Somit ist der „Hintergrund“ für die Nukleinsäuren unzugänglich.

Für die Selektion von ssDNA-Aptameren ist die Einzelstranggenerierung entscheidend. Dazu wurden bereits verschiedene Methoden beschrieben: Die Markierung eines Strangs der dsDNA (über einen 5'- oder 3'-Primer) und Entfernen dieses Strangs nach Hitzedenaturierung [75] oder über eine asymmetrische PCR, bei der nur ein oder eine deutlich größere Menge eines Primers verwendet wird, um einzelsträngige DNA zu erhalten [131]. Werden DNA-Stränge unterschiedlicher Länge mittels modifizierter Primer erzeugt, z.B. über einen 3'-Ribose-Rest (riboU) [119] oder einen Hexaethylenglykol-(HEGL)-Spacer an einem um 20 Adenine verlängerten Primer [124], so können diese elektrophoretisch getrennt und aus dem Gel separiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem selektiven enzymatischen Abbau eines phosphorylierten Strangs doppelsträngiger DNA durch die Lambda (λ)-Exonuklease. Dieses Enzym besitzt eine hohe 5' zu 3'-Exodeoxyribonuklease-Aktivität und wurde schon 1989 von Higuchi & Ochman [40] für die Einzelstranggenerierung nach der DNA-Amplifikation eingesetzt. Da diese Methoden nicht nur speziell modifizierte Nukleinsäuren sondern auch zusätzliche Arbeitsschritte erfordern, wurde die von Bruno & Kiel [13] erfolgreich eingesetzte Methode der Denaturierung und Abkühlen auf Eis von PCR-Produkt zur Ausbildung einheitlicher Strukturen [3] angewendet. Es ist jedoch anzumerken, dass dies bei geringer Diversität in späteren Selektionsrunden zu Problemen führen kann; die wenigen verbliebenen Sequenzen liegen in einer hohen Kopienzahl vor und können folglich rasch rehybridisieren.

Zusätzliche Waschschrte, kombiniert mit größeren Volumina, erhöhen den Selektionsdruck über die Runden [62]. Zusätzlich bewirkt eine Reduktion des eingesetzten Nukleinsäurepools (pmol DNA/RNA) gegenüber der Targetmenge (μ l Magnetpartikel) eine Erhöhung der Stringenz.

Für die erste Selektion eines ssDNA-Aptamers gegen Streptavidin in 10 Runden wurde eine Bank mit 40 randomisierten Positionen (Bank40) gewählt. Die aus der Amplifikationsreaktion jeder Selektionsrunde gewonnene DNA-Menge wurde zur Beurteilung des Prozesses herangezogen. Trotz steigender Stringenz über die Selektion genügten immer weniger PCR-Zyklen zur Erzeugung ausreichender DNA-Mengen für die nachfolgende Selektionsrunde (s. 4.1, Tab. 20). Zudem ließ sich nach der dritten Selektionsrunde eine Anreicherung von Sequenzen nachweisen (s. 4.1.1, Abb. 16) sowie eine Akkumulation bindender Sequenzen in den Pools der Runden (s. 4.1.2). Eine effiziente Bindung an das Zielmolekül ließ sich erst ab der sechsten Runde nachweisen (s. Abb. 17).

Im Anschluss an die 10. Selektionsrunde erfolgte eine Klonierung in einen geeigneten Vektor und eine Sequenzierung nach Sanger von 25 Klonen. Aufgrund von Sequenzhomologien konnten diese in neun Familien eingeteilt werden (s. 4.1). Dies lässt die Vermutung zu, dass der Pool nach der zehnten Runde nur noch aus wenigen Sequenzen bestand. Dieser Datensatz ist für eine statistische Auswertung oder auch die Ermittlung relevanter Motive mittels MEME [1] relativ klein und daher eher ungeeignet.

Per Solexa-Hochdurchsatzsequenzierung ließen sich insgesamt ca. 13 Mio. Sequenzen erfassen und anhand der Markierungssequenzen (Barcode) ca. 7 Mio. Sequenzen den Selektionsrunden zuordnen und nachfolgend bioinformatisch auswerten (s. 4.1.3). Weitergehende Analysen erfolgten mit den 100 häufigsten Sequenzen (s. Anhang, Tab. A7).

Bemerkenswerterweise sind die „besten“ Binder aus der Sanger-Sequenzierung nach der zehnten Runde (S1C10 an Position 1 und S1C18 an Position 86) bereits in den ersten Zyklen nachweisbar – allerdings in ausgesprochen geringer Kopienzahl (7 bzw. 4 bei ca. 200.000 Sequenzdaten), die nur geringfügig über dem Hintergrund von zwei Kopien pro Sequenz liegt. Weitere angereicherte Sequenzen (S1R10#4, S1R10#6 und S1R10#10) traten erst ab der zweiten und dritten Runde in Erscheinung. Der höchste beobachtbare prozentuale Anteil eines Einzelklons am Pool einer Selektionsrunde betrug für S1R10#6 in der fünften Runde 19%, in der sechsten Runde 22%. Dieser Anteil sank ab der sechsten Runde zugunsten der besten Binder und häufigsten Sequenzen der zehnten Runde (S1R10#1 und S1R10#2) ab (s. Abb. 18).

Bindungsrelevante Motive wurden mit dem Sequenz-Analyseprogramm MEME [1] identifiziert; es analysiert Datensätze mit einer Größe bis zu 1000 Sequenzen. Folglich wurden in dieser Studie nur die 100 häufigsten Sequenzen zur Untersuchung herangezogen. Das Motiv ACGC konnte in einem überwiegenden Teil der in weiteren Bindungsstudien analysierten Klone ermittelt werden. Gleiches gilt für das Palindrom dieses Motivs (ACGCNNNNNCGCA), dessen Häufigkeit von der dritten bis zur sechsten Selektionsrunde sprunghaft zu- und anschließend wieder abnimmt (s. Abb. 20).

Dieses Motiv konnte mit ähnlicher Abfolge auch in anderen DNA-Aptameren gegen Streptavidin [120] festgestellt werden; eingehender analysierten es z.B. Bing et al. [9].

Insgesamt belegen diese Resultate deutlich, dass eine Anreicherung zum Teil stark bindender Sequenzen schon in den ersten Selektionsrunden stattfindet. Da diese aber nur in einer geringen Kopienzahl vorliegen und damit nur wenig über dem Hintergrund liegen, kann eine Identifizierung nur mittels Hochdurchsatzsequenzierung erfolgen.

Zusätzliche *in vitro*-Selektionen von DNA-Aptameren ohne Präamplifikation der Bank gegen Streptavidin sollten belegen, dass eine Reduktion auf drei Runden mit anschließender Hochdurchsatzsequenzierung zur Identifizierung bindender Sequenzen ausreicht.

Für die erste, nach einem verkürzten Protokoll durchgeführte Selektion von DNA-Aptameren wurden gezielt längere Inkubationszeiten mit dem Zielmolekül Streptavidin gewählt. In diesem Experiment wurde keine voramplifizierte, sondern die synthetische generierte, einzelsträngige Bank30 eingesetzt. Somit ist von einer höheren Diversität auszugehen. Zudem wurde eine höhere Menge an DNA im Verhältnis zu Zielmolekülen eingesetzt. Bei einer Inkubationszeit von

zwei Stunden ist bei diesen Parametern, die Assoziation bindender Sequenzen an das Zielmolekül zu erwarten.

Einer Verringerung der Magnetpartikelmenge (und damit der Zielmoleküle und der DNA-Menge) sowie eine Erhöhung der Waschschrte sorgte für eine Stringenzzunahme. Obgleich mithilfe des Mikrotiterplatten-Bindungsassays (FLAA) der einzelnen Selektionsrunden eine Zunahme bindender Sequenzen festgestellt werden konnte, waren diese nicht die in der Hochdurchsatzsequenzierung ermittelten häufigsten Sequenzen (S2R3#1, S2R3#2). Dies könnte durch die fehlenden Primersequenzen bei der Analyse bedingt sein, da diese durchaus in die Bindung des Zielmoleküls involviert sein können [5, 77, 123]. Weiterhin wurde für die zweite und dritte Selektionsrunde (denaturierte) dsDNA verwendet, weshalb auch der komplementäre Strang (=antisense) für die Targetbindung in Frage kommen kann.

Der Datensatz der Solexa-Sequenzierung erwies sich für eine detaillierte Analyse der Selektion als unvollständig, da die zweite Runde fehlte – ein weiteres SELEX-Experiment wurde als notwendig erachtet.

Die dritte DNA-Aptamer-Selektion (s. 4.3) gegen Streptavidin zeigte eine Verbesserung bzw. Beschleunigung der Zielmolekül-Assoziation (K_{on}) – durch kürzere Inkubationszeiten und geringere Mengen an Magnetpartikeln. In diesem SELEX-Experiment wurde die Bank30 mit unterschiedlichen Sequenzlängen generiert und durch verschiedene Primersets (Pro5/Pro3: je 18 bp; T7Pro3/T7Pro5: je 36 bp) eingesetzt. Auf diese Weise lassen sich verschiedene Aufreinigungsmethoden (Säulen, Magnetpartikel) für die amplifizierten Nukleinsäuren testen. Zudem kann der Einfluss der Primersequenzlänge auf das Bindungsverhalten überprüft werden; ihr wird eine stabilisierende Funktion zugesprochen [5].

Überdies wurden Streptavidin-derivatisierte Magnetpartikel verschiedener Hersteller verwendet. Diese unterschieden sich im Durchmesser und in der Dichte des immobilisierten Proteins (s. Tab. 26). Vermutlich sind kleinere Partikel für die Selektion geeigneter, sie weisen ein günstigeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auf.

Im NGS-Datensatz der zweiten 3-Schritt-Selektion sind die später als „Binder“ identifizierten Sequenzen nicht in den ersten Selektionsrunden nachzuweisen. Anders bei der 10-Runden-SELEX: Hier sind Klone mit guter Bindungseigenschaft bereits sehr früh angereichert, später wurden diese allerdings von anderen, eventuell besser replizierenden, Sequenzen verdrängt. Da für diese Selektion eine prä-amplifizierte Bank eingesetzt wurde, konnten schon in der ersten Runde von den Sequenzen mit einer hohen target-assoziation mehrere Kopien in die Amplifikationsreaktion eingetragen werden. Für die durchgeführten 3-Schritt-Selektionen wurde die aus der Synthese stammende einzelsträngige Bank verwendet, weshalb es mehrere Runden erforderte, um bindende Sequenzen über dem Hintergrund anzureichern.

Ein bedeutender Faktor für (*in vitro*-)Evolutionsprozesse ist die Mutagenese [10]. Bei der DNA-Amplifikation mit einer *Taq*-Polymerase ohne Korrekturlesefunktion (*proof reading*) findet alle 9000 Basen eine Basensubstitution statt [112]. Eine ähnliche Fehlerrate ist bei der Sequenzierung mit der Solexa-Technologie zu beobachten (bei einem Q-Score von 30; [82]). Folglich weist bei der Bank40 (76 bp) pro Amplifikationszyklus ca. jedes 120. Molekül eine Mutation auf, bei der Bank30 (66 bp) jedes 135. Molekül. Werden für ein 3-Schritt-SELEX-Experiment initial nur 500 bis 2000 pmol einzelsträngige DNA-Moleküle eingesetzt (s. 4.2, 4.3) und ca. 20 bis 25 Amplifikationszyklen durchgeführt, so kann dabei die Mutageneserate nicht ausreichend für die Selektion „guter Binder“ sein.

Eine Reduktion der iterativ durchgeführten Schritte bei einem SELEX-Experiment auf nur eine Runde, wie für die MonoLexTM-Methode beschrieben [78], wäre auch für eine partikelbasierte Selektion möglich. Das ist bei Verwendung einer geringeren Diversität (z.B. Bank20, 20 randomisierte Positionen in der Bank) oder mit einer höheren Anzahl an Kopien pro Sequenz wie es in der ersten Streptavidin-Selektion mit dem Klon S1R10#86 zu beobachten war. Ein derartiges Verfahren würde es ermöglichen auch modifizierte Nukleinsäuren zum Schutz vor nukleolytischem Abbau [54], zu selektieren. So wäre keine Amplifizierung notwendig, bei der die „Information“ über die Modifikation verloren gehen würden. Wird demgegenüber wie bei der MonoLexTM-Methode die Nukleinsäure-Bibliothek mit nur einer einzelnen Kopie pro Sequenz eingesetzt, so müssen anschließend sehr viele Klone getestet werden, um bindende Sequenzen zu identifizieren.

Zur kommerziellen Verwendung des SELEX-Verfahrens ist eine nähere Betrachtung des Kosten-/Nutzen-Aufwands unerlässlich. Selbst bei einer halbautomatisierten Durchführung [128] sind für eine Aptamer-Selektion mit zehn und mehr Runden (samt anschließender Klonierung, Vereinzelung der Sequenzen und Sanger-Sequenzierung) mindestens zwei Wochen zu veranschlagen [33]. Noch zeitaufwendiger ist die Selektion von RNA-Aptameren, die trotz Automatisierung der mehrstufigen RNA-Amplifikation [20, 21] mindestens drei Wochen dauert [33]. Dabei kann vor Abschluss einer Selektion keine Aussage über deren Erfolg getroffen werden.

Der Einsatz magnetischer Partikel als Selektionsmatrix [105] und eine damit einhergehende Automatisierung [128] kann durch Reduktion der eingesetzten Volumina und Zielmolekülmengen zur grundlegenden Effizienzsteigerung der Methode führen. Die Parallelisierung von bis zu 96 Selektionen und eine Identifizierung potenzieller Binder über Hochdurchsatzsequenzierung gestatten eine verbesserte kommerzielle Nutzung des SELEX-Verfahrens.

Ein auf wenige Runden reduziertes Selektionsverfahren mit anschließender Auswertung der NGS-Daten erlaubt eine frühe Einschätzung der Sequenzanreicherung; bioinformatische Analysen des Datensatzes können Aufschluss über bindungsrelevante Motive geben. Zudem

identifiziert diese Vorgehensweise bereits bekannte Matrixbinder anhand ihrer Sequenzen, um diese aus dem Sequenzpool (Datensatz) entfernen zu können bzw. nicht erneut testen zu müssen. Eine Gegenselektion [106] ist somit nicht zwingend notwendig.

Da eine Synthese kurzer Oligonukleotide nicht nur preisgünstig ist, sondern auch rasch ausgeführt werden kann, ist eine Charakterisierung vieler synthetischer Klone als weitaus kostengünstiger anzusehen, als das bisher etablierte SELEX-Protokoll.

5.2 Diversitäts-Assay

Der Erfolg eines SELEX-Experiments zeigt sich durch die Anreicherung bindender Sequenzen. Um eine Diversitätsabnahme über die Selektionsrunden observieren zu können, wurde der Diversitäts-Assay entwickelt [59, 95].

Bisherige Diversitätsbestimmungen einer Nukleinsäure-Population anhand von Schmelzkurven – wie der Cot-Assay [12] – erfordern entweder aufwendige Berechnungen, die zu keinem raschen und augenfällig vergleichbaren Ergebnis führen, oder sie bergen aufgrund starker Extrapolation die Gefahr, Fehler mitzuführen.

Eine Adaption an moderne *real time*-PCR-Geräte stellt die 2006 von Baum & McCune vorgestellte AmpliCot-Methode dar [4]. Die Schmelztemperatur von zuvor amplifizierte Nukleinsäurepools wird hierbei mithilfe des doppelstrangbindenden Farbstoffes SYBR[®]-Green I gemessen.

Rückschmelzkurven unbekannter Proben und ein mitgeführter, einfach zu synthetisierender Standard gleicher Länge (hier: 76 N) erlauben über den visuellen Vergleich der Profile eine schnelle und einfache Einschätzung der Diversität von Einzelklonen (z.B. Div0N) bis hin zu $2,7 \times 10^8$ verschiedenen Sequenzen (z.B. Div14N). Der Assay gibt zudem raschen Aufschluss über den Erfolg einer *in vitro*-Selektion; unbekannte DNA-Populationen lassen sich auf diese Weise normieren und charakterisieren. Damit liefert dieser Assay einen entscheidenden Beitrag zur besseren Nutzung von Zeit und Ressourcen.

Veränderungen in der Rückschmelzkinetik gehen auf die Länge und die Verteilung vollständig hybridisierter Regionen nach Schmelzen und Rehybridisieren zurück. Gleichermaßen wird auch die Bildung von Heteroduplexen begünstigt; diese scheinen bei Standards ab Div10N (10^6) vermehrt aufzutreten und führen zu einer Verlagerung der Schmelztemperatur.

Grundsätzlich liegen die Ausschläge der Rückschmelzkurven der Proben Div0N (Einzelklon) bis Div4N (256 verschiedene Sequenzen) derart dicht beieinander, dass eine rein visuelle Auswertung problematisch ist. Für Diversitäten von mehr als 400 verschiedenen Klone (Div6N)

lassen sich jedoch die Ausschläge der Kurven hinreichend genau unterscheiden. Unter Umständen ist auch die graphische Darstellung der ermittelten Schmelzpunkt-Maxima von Vorteil.

Bei der Analyse der ersten Streptavidin-SELEX (s. 4.1) zeigte sich durch die auffällige Verlagerung der Rückschmelztemperatur ab der vierten Selektionsrunde (s. Abb. 16b) eine Reduktion der Sequenzdiversität auf weniger als 256 Klone (entspricht Div4N).

In vitro-Selektionen, die mit nur 3 Zyklen durchgeführt und anschließend mittels *next-generation sequencing* (NGS) analysiert wurden (4.2, 4.3, 4.7), bedurften keiner separaten Diversitätsbestimmung; eine exakte Spezifizierung von Diversität und Komplexität konnte direkt aus den Sequenzierdaten hergeleitet werden.

5.3 Hochdurchsatzsequenzierung

Bei allen derzeitig erhältlichen NGS-Technologien ist zu bemerken, dass sich die Kosten für eine Hochdurchsatzsequenzierung stetig reduzieren und sich zugleich das Anwendungsspektrum erweitert [68, 130]. In dieser Studie konnte die Hochdurchsatzsequenzierung für eine eingehende Charakterisierung und zum detaillierten Informationsgewinn von Selektionsereignissen genutzt werden. Hierzu wurden alle 10 Runden des ersten SELEX-Experiments mit der Solexa-Technologie sequenziert (s. 4.1.3) und diese Daten anschließend sehr eingehend analysiert.

Kurze, über die Primer eingefügte Barcode-Sequenzen (6 Basen lang, s. Tab. 13) erlaubten die parallele Sequenzierung aller Selektionsrunden, inklusive der initial eingesetzten Bank und eine spätere Zuordnung. Auf diese Weise konnte das Potential der Solexa-Sequenzierung, mit bis zu 40-50 Mio. Sequenzen pro Lauf [61] optimal genutzt werden.

Auch wenn die Kosten für eine Sequenzierung mit der NGS-Technologie kontinuierlich sinken, die Kosten halbieren sich alle fünf Monate [103], so ist der reale Zeitaufwand für viele Anwendungen noch immer zu groß. Mit der zunehmenden Kommerzialisierung und der höheren Auslastung der Geräte ist allerdings zu berücksichtigen, dass die für eine Sequenzierung mittels NGS-Technologie veranschlagte Zeit deutlich sinken wird.

Derzeit ist noch eine weitere Spielart der Pyrosequenzierung dabei sich zu etablieren: Die *Ion Torrent*-Technologie. Sie basiert auf der nicht-optischen, ionensensitiven Messung von Protonen und stellt eine günstige Alternative zur schnellen Sequenzierung großer Diversitäten dar [88].

Für eine Hochdurchsatztechnologie wie die SELEX-Methode bedeuten aktuelle Sequenzierungsverfahren nicht nur das Einsparen ergebnisverzerrender Klonierungsschritte. Sie ermöglichen zudem durch das Einfügen kurzer Markierungssequenzen (Barcodes), alle Selektionsrunden parallel zu sequenzieren und damit die Akkumulation einzelner Klone zu verfolgen. Auf diese Weise lässt sich eine *in vitro*-Selektion genauer analysieren und die Anzahl der Selektionsrunden deutlich reduzieren.

Für die Identifizierung bindungs-relevanter bzw. aptamer-spezifischer Motive mittels MEME und statistischer Erhebungen muss der zu analysierende Datensatz ausreichend groß sein. Dies kann durch Klonierung, Vereinzelung und Sanger-Sequenzierung einzelner Klone nicht gewährleistet werden, jedoch durch die Generierung hochkomplexer Datensätze mit der Hochdurchsatzsequenzierung kann diese Menge erreicht werden.

5.4 Charakterisierung der Streptavidin-Aptamere

Bei der Auswertung der ersten Streptavidin-Selektion mithilfe des Sequenzanalyseprogramms MEME [1] ließ sich das Motiv ACGCNNNNNCGCA ab der dritten Runde mit ansteigender Häufigkeit identifizieren (s. Abb. 20a/b). Dieses Palindrom konnte jedoch nicht in den zwei weiteren 3-Runden-SELEX-Experimenten gefunden werden; dafür das kürzere Motiv ACGC (s. Abb. 22).

Ähnliche Basenabfolgen traten auch in Streptavidin-Aptameren (DNA) anderer Studien [9, 105, 120] auf. Allerdings scheint für die Zielmolekülassoziation die dreidimensionale Struktur insgesamt bedeutsamer zu sein [9]; diese ist mit dieser Methodik nicht bestimmbar.

Alle für Bindungsstudien ausgewählte Sequenzen der Streptavidin-Selektionen wurden nach dem Zuker-Algorithmus hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturen analysiert (s. 4.4.1). Dies erfolgte sowohl mit Primerregionen (wie im Selektionsprozess) als auch ohne Primerregion (wie in Studien zur Bindungsqualität). Die Primersequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Banken wurden gezielt so gewählt, dass sie keine Struktur ausbilden konnten.

Insbesondere für Sequenzen, die sich als „gute Binder“ erwiesen (S1C10, S1R10#1a, S1R10#10, S3T7IR3#1, S3T7IR3#3), ließ sich eine Sekundärstruktur von zwei hintereinander liegenden Haarnadelstrukturen bei beiden Sequenzlängen ermitteln. In nahezu allen endständigen Auswölbungen der Haarnadeln befand sich das zuvor ermittelte Motiv ACGC. Auch bereits beschriebene DNA-Aptamere gegen Streptavidin weisen diese Strukturen auf [9, 120].

Eine spätere kommerzielle Anwendung erfordert möglichst geringe Herstellungskosten der Aptamersequenzen. Daher wurden für Bindungsstudien synthetisch hergestellte Einzelklone ohne Primersequenz verwendet, auch wenn die Primersequenz als stabilisierend bzw. als bedeutend für die Bindung bei Aptameren gilt [5, 77, 123].

Mit den FLAA-Bindungsstudien (s. 4.4.2) konnte die spezifische Bindung einiger Aptamersequenzen an Streptavidin nachgewiesen werden. Nahezu alle getesteten Sequenzen zeigen eine höhere Affinität für das Zielmolekül als für das Kontroll-Oligo (Negativ-Kontrolle), aber nur ca. $\frac{2}{3}$ der Klone erwiesen sich als spezifisch, d.h. sie zeigten keine Bindung an Streptavidin-Biotin. In wie weit eine Anpassung des Protokolls durch z.B. weitere Waschschriffe, die Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität verändern würde, müsste getestet werden. Auch wäre eine Bindung der Aptamere außerhalb der Biotin-Bindestelle denkbar, worüber Kristallstrukturanalysen Aufschluss geben könnten.

Die detektierte Bindung an Streptavidin-Biotin (Negativ-Kontrolle) könnte unspezifisch sein und sich durch zusätzliche Waschschriffe minimieren lassen bzw. es handelt sich um eine spezifische Bindung – für das erste und zweite SELEX-Experiment wurden nicht-kompetitive Elutionsbedingungen (PCR mit Magnetpartikeln bzw. EDTA + Denaturierung) gewählt. Auch außerhalb der Biotin-Bindungsstelle könnten gebundene Nukleinsäuren angereichert worden sein.

In der dritten Selektion erfolgte die Elution zwar kompetitiv (d.h. mit Biotin) doch eine Inkubationstemperatur von 60°C beeinflusst die bindungsrelevante Sekundärstruktur außerhalb der Bindungstasche gebundener Aptamere und könnte ein Loslösen der Nukleinsäuren bedingen. Grundsätzlich gestattet der FLAA lediglich eine qualitative Einschätzung des Bindungsvermögens.

Als valide und vergleichbare Methode zur Bestimmung einer Dissoziationskonstante von Aptameren an ihr Zielmolekül und des Bindungsverhaltens (Assoziation und Dissoziation) verschiedener Klone gilt die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [63]. Wie bereits bei den FLAA-Bindungsstudien wurden Aptamere in 1× BP denaturiert und auf Eis gekühlt, um so die Bildung bindungsrelevanter Sekundärstrukturen zu begünstigen. Hierbei ist die Kinetik der Faltung für Assoziation (K_{on}) und Dissoziation (K_{off}) an das Zielmolekül entscheidend.

Die Sensorgramme dokumentieren einen ähnlichen Verlauf für Assoziation und Dissoziation der Aptamere an das Zielmolekül. Klon S1C10 tritt durch seine besonders starke Affinität an Streptavidin hervor, die Klone S1C8a, S3T7IR3#3 und S3T7IR3#5 zeigen hingegen schwache Dissoziation (flacher Abfall der Kurve, s. Abb. 26). Für bestimmte biotechnologische Anwendungen (z.B. Chromatographie) könnte diese Eigenschaft – trotz der schwächeren Dissoziationsskonstante – von Vorteil sein.

Bemerkenswerterweise zeigen nicht unbedingt die häufigsten Klone der ersten Selektion (S1R10#1 und S1R10#2) das stärkste Bindungsverhalten, sondern die Aptamere S1C10 und S1C18. Diese stehen an Position 17 bzw. 86 in der NGS-Rangliste der 10. Selektionsrunde, sind jedoch in den Selektionsrunden 1 und 2 zahlreich vertreten (s. Anhang, Tab. A7). Indessen bindet der häufigste Klon (S1R10#1a) nur in komplementärer Orientierung (antisense), nicht aber als sense-Strang (S1R10#1).

Bei den aus der 3-Runden-SELEX (4.3) hervorgegangenen 30mer-Aptameren ließ sich nur für die mit Dynabeads® (INVITROGEN™) selektierten, verlängerten Sequenzen (S3T7IR3#1, #3 und #5) eine Bindung beobachten. Da je nach Länge unterschiedliche Aufreinigungsmethoden verwendet werden, kann keine Aussage getroffen werden, ob allein die Primersequenzlänge für das Bindungsverhalten entscheidend ist; die „besten Binder“ waren allerdings auch die häufigsten Sequenzen.

Weiterhin ließ sich beobachten, dass auch Klone die das Motiv ACGC enthielten keine nachweisbare Bindung in den SPR-Studien zeigten. Zum einen könnten hierfür die bereits erwähnten fehlenden Primersequenzen zur Stabilisierung der bindungsrelevanten Struktur verantwortlich sein [5, 77, 123], zum anderen besteht die Möglichkeit, dass aufgrund des Kürze der Basenabfolge das Motiv nur zufällig enthalten ist.

Zusammengenommen deuten die o.g. Ergebnisse auf eine starke Verzerrung während der Selektion, zugunsten der Amplifikations-Effizienz gegenüber dem Bindungsverhalten, hin. Es empfiehlt sich daher eine Verkürzung des Selektionsprozesses auf nur drei Zyklen.

5.5 Anwendungen von Streptavidin-Aptameren

Mögliche Anwendungen für die gegen Streptavidin selektierten Aptamere lassen sich durch die Affinitätschromatographie rekombinanter Fusionsproteine aufzeigen (s. 4.5). Eine Streptavidin-Aufreinigungsmethode, bei der auf Biotin verzichtet werden kann, ist überdies von großem wirtschaftlichen Interesse.

Experimente zur Affinitätschromatographie wurden vor der Affinitätsbestimmung durch die Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt. Das Bindungsvermögen ließ sich daher nur aus den Ergebnissen des FLAA und der Hochdurchsatzsequenzierung ableiten. Auch stand die dritte Aptamer-Selektion noch aus.

Die für diese Experimente notwendige kovalente Kopplung von Streptavidin-Aptameren an magnetische Partikel sowie die Bindung von Streptavidin an die S1C10-Partikel (unter realistischen Bedingungen), konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Jedoch zeigte der, aufgrund seiner Häufigkeit in der dritten Selektionsrunde, als erfolgversprechend eingeschätzte

Klon S2R3#1 keine nachweisbare Bindung an Streptavidin. Auch wenn eine Bindung von Streptavidin an das immobilisierte Aptamer S1C18 unter ähnlichen Bedingungen wie in der Affinitätschromatographie mittels Magnetpartikel-ELISA nachgewiesen werden konnte (s. 4.5.2), war eine Aufreinigung eines rekombinanten Streptavidin-Fusionsproteins mit den Aptameren aus Zelllysat nicht möglich. Hierfür können verschiedene Ursachen gefunden werden. Das Bindungsvermögen des Aptamers lässt sich aufgrund des deutlichen Größenunterschiedes (MBP-SA: 230 kDa; SA: 67 kDa) nicht direkt übertragen. Eine effektive Bindung und damit Aufreinigung kann aufgrund der Molekülmasse sterisch nicht möglich sein. Auch könnte entweder die Verwendung eines Klons mit einer stärkeren Assoziation (K_{on}) wie S1C10 oder mit einer bemerkenswert schwachen Dissoziation (K_{off}) wie S1C8a oder S3T7IR3#3 für den Chromatographieprozess förderlich sein. Entweder weil das Zielmolekül schneller und stärker gebunden wird oder weil die Dissoziation, d.h. das Ablösen des Zielmoleküls vom Aptamer, verlangsamt ist.

Weiterhin könnten experimentelle Variationen wie die Verwendung eines Spacers oder der Einsatz repetitiver Aptamersequenzen [16] zum Erfolg führen.

5.6 Emulsionen

In Wasser-in-Öl durchgeführte Amplifikationsreaktionen von hoch diversen Nukleinsäurepools zeigten in der elektrophoretischen Auftrennung deutlich weniger Artefakte als emulgierte Proben (s. Abb. 32).

Moderne Hochdurchsatz-Technologien wie auch der SELEX-Prozess können mithilfe dieses Protokolls effizienter und kontrollierbarer durchgeführt werden. Die Kombination mit gängigen Aufreinigungskomponenten vereinfacht die Integration in bestehende Arbeitsabläufe.

Neben der PCR können Emulsionen auch in anderen Arbeitsgebieten, die mit diversen Banken verbunden sind, wie die Amplifikation von gDNA oder cDNA, sowie Haplotypisierung, Prozesse der gerichteten molekularen Evolution und Selektionen für die Optimierung neuer Enzyme [38].

Die erzielten Ergebnisse und Protokolle dieser Arbeit haben maßgeblich zu der Entwicklung des mittlerweile kommerziell erhältlichen Kits für Amplifikationsreaktionen in Emulsionen (Micellula, ROBOKLON, EURx) beigetragen.

5.7 *In vitro*-Selektion von RNA-Aptameren, Q β -Replikase für die RNA-Amplifikation

Gegen die medizinisch und diagnostisch relevanten Zielmoleküle Serotonin, Histamin, Dopamin und Norepinephrin wurde eine RNA-SELEX mit drei Selektionsrunden durchgeführt. Die Amplifikation der RNA erfolgte durch die Q β -Replikase in Wasser-in-Öl-Emulsionen. Angereicherte Sequenzen wurden durch eine Hochdurchsatzsequenzierung nach der dritten Runde ermittelt (s. 4.7). Für eine erste qualitative Bindungsstudie wurden die häufigsten Klone ausgewählt und getestet (s. 4.7.1).

Die reverse Transkription (RT) gilt als unerlässliche Methode für die Selektion von RNA-Aptameren. In der Regel werden zwei verschiedene Enzyme verwendet: die reverse Transkriptase (schreibt RNA in cDNA um) und Taq-Polymerase (für die Amplifikation). Diese durch einen Aufreinigungsschritt getrennt voneinander ablaufenden Reaktionen bedeuten zusätzlichen Zeit- und Kostenaufwand.

Besonders strukturbildene Sequenzen sind bei der Aptamer-Selektion von Interesse, daher ist es wichtig die Reaktionsbedingungen so zu wählen, dass diese bei der reversen Transkription und bei der Amplifikation berücksichtigt werden. Dieser Umstand lässt sich z.B. durch höhere Inkubationstemperaturen erreichen; es empfiehlt sich die Verwendung der Taq-Polymerase, die bei einer hohen Mangankonzentration (2-3 mM) zudem eine reverse Transkriptase-Aktivität besitzt [48, 97]. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (72°C) liegt erheblich höher als bei herkömmlich verwendeten reversen Transkriptasen (42-50°C), zudem ist dieses Enzym kostengünstig und leicht verfügbar.

Eine weitere hitzestabile Polymerase, die in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen als reverse Transkriptase fungieren kann, ist die Tth-Polymerase des Eubakteriums *Thermus thermophilus* [74]. Obwohl diese effizienter als die Taq-Polymerase ist und ein Temperaturoptimum von 60-70°C besitzt [74], war ihre Verwendung in dieser Studie nicht notwendig: Die zu transkribierende RNA lag in derart großen Mengen vor, dass nicht die Prozessivität ausschlaggebend war, sondern die preisgünstige, simplifizierte Durchführung der Experimente.

Die in dieser Studie für die Amplifikation von ssRNA verwendete Q β -Replikase ist in der Lage von kurzen, schnell replizierenden Oligonukleotiden (≤ 250 N) innerhalb von 10 Minuten über 10^{10} Kopien zu erstellen [115]. Diese bemerkenswerte Geschwindigkeit wird erreicht, indem das Enzym zunächst an das 3'-Ende der einzelsträngigen RNA-Matrize (plus-Strang) bindet und dann den komplementären ssRNA-Strang (minus-Strang) synthetisiert, welcher gleichfalls wieder als Templat dienen kann [8]. Die Reaktion verläuft isothermal und jede Replikation beginnt sofort nach Beendigung der vorherigen [115]. Dies führt zu einer exponentiellen Amplifikation, solange das Enzym im Überschuss vorliegt.

Die ausgesprochen hohe Prozessivität des Enzyms nutzte Sol Spiegelman bereits 1972 für einen Nachweis der Evolution *in vitro* [50]: Bei dem seriellen Transfer amplifizierter RNA reduzierte sich das ursprünglich 4200 Basen lange Q β -Gemon nach 74 Übertragungen auf 218 Nukleotide [50]. Die als „Spiegelman-Monster“ beschriebenen, kurzen Sequenzen besitzen nur noch 15% der Original-Genomlänge und zeichnen sich durch ihre rasche Replizierbarkeit aus.

In dem ursprünglich beschriebenen SELEX-Verfahren zur Selektion von RNA-Aptameren wird neben der reversen Transkription (RNA zu DNA), PCR und *in vitro*-Transkription (DNA zu RNA) für die Vervielfältigung der Nukleinsäuren auch die isothermale Amplifikation mittels Q β -Replikase genannt [114]. Jedoch auch bei der gezielten Amplifikation von RNA mit Q β -Replikase treten kurze schnell-replizierende Sequenzen auf und verhindern eine Anreicherung der gewünschten Sequenzen. Erst durch *in vitro*-Kompartimentierung der Amplifikationsreaktion lassen sich derartige Kontaminationen vermeiden [117] und damit in den SELEX-Prozess zur Gewinnung von RNA-Aptameren integrieren (s. Abb. 35).

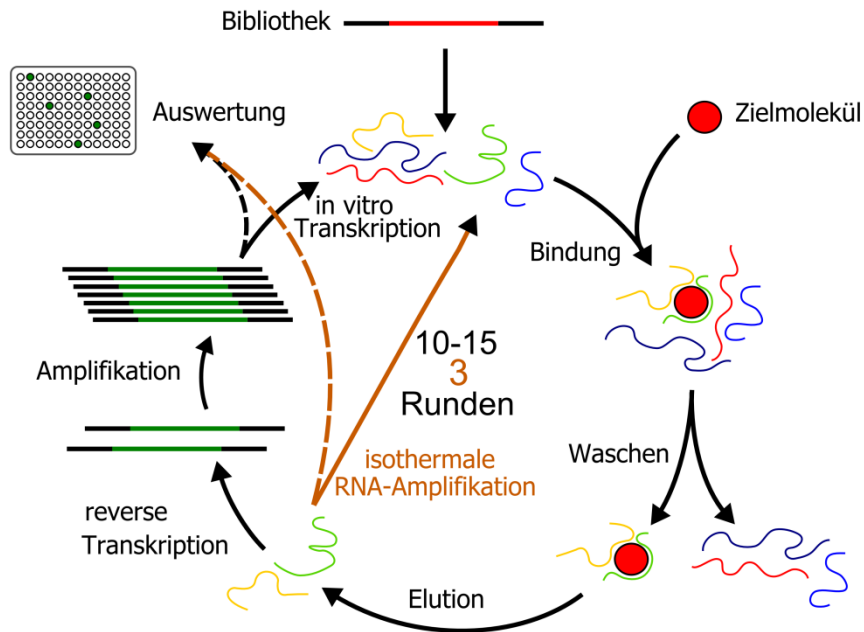


Abb. 35: Optimierung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von RNA-Aptameren mittels isothermaler Amplifikation. Eine Nukleinsäurebibliothek (RNA) wird mit einem Zielmolekül inkubiert, nicht bindende Sequenzen werden entfernt und nach Elution der Zielmolekül-assoziierten Moleküle erfolgt deren Vervielfältigung. Es kann (wie nach bestehenden Protokollen) über reverse Transkription, PCR und *in vitro*-Transkription verfahren werden – oder über die isothermale Amplifikation mittels Q β -Replikase: Für eine Anreicherung werden zumeist 10 bis 15 Zyklen durchlaufen, bevor durch Klonierung die Sequenzen vereinzelt und anschließend sequenziert und identifiziert werden. Erfolgt die Identifikation angereicherter Sequenzen hingegen über NGS, so sind drei Zyklen ausreichend (roter Pfeil).

Die zufallsbasierte Mutagenese ist ein bedeutender Evolutionsfaktor innerhalb des *in vitro*-Selektionsprozesses [10]. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase (ein Austausch alle 9000 Basen, [112]) besitzt die Q β -Replikase eine mehr als zehnmals höhere Fehlerrate bei der Amplifikation

(eine Substitution alle 700 Basen [56]), womit sie sich deutlich besser für das RNA-SELEX-Verfahren eignet.

Auch wenn die Replikation für ihre Initiation keine Primer erfordert, so besitzt die Q β -Replikase dennoch eine hohe Templatspezifität – obwohl die Wirts-RNA in hohem Überschuss gegenüber dem Phagengenom vorliegt, wird sie nicht amplifiziert. Zwei bedeutende Strukturelemente entscheiden, ob eine RNA exponentiell amplifiziert wird (RQ-RNA des *legitimate template*) oder nicht (*illegitimate template*) [115]. Das 3'-Ende weist ein Oligo-C-Motiv (zumeist CCC) auf, entsprechend findet sich am 5'-Ende ein komplementäres Oligo-G-Motiv. Zudem sind die 8 N- bis 15 N-langen, pyrimidinreichen, internen Sequenzen von Bedeutung. Durch sie können ausgeprägte Sekundärstrukturen in Form von langen, stabilen Haarnadelschleifen ausgebildet werden, siehe Abbildung 36 [115].

Für die für die RNA-SELEX eingesetzte Bank QST40 wurde die von Ugarov et al. [115] als besonders gut replizierbare Sequenz RQ135 zugrunde gelegt. Die Primerbereiche entsprachen z.T. dieser Sequenz und enthielten die für die Initiation des Enzyms notwendigen Haarnadelstrukturen (s. Abb. 36). Der in der Abbildung grau unterlegte Bereich wurde durch 40 randomisierte Positionen ersetzt.

In den Selektionen von RNA-Aptameren gegen die kleinen Moleküle Serotonin, Histamin, Dopamin und Norepinephrin in drei Runden und mit der Q β -Replikase zur isothermalen RNA-Amplifikation in Emulsionen sind Sequenzen angereichert worden. Diese konnten durch die Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert und anschließend getestet werden. Die angewandte Methode zum Nachweis einer Bindung der Aptamere an ihr Zielmolekül war zunächst noch unspezifisch und bedarf noch einiger Weiterentwicklung. Auch sollten SPR-Studien durchgeführt werden, um Aufschluss über Bindungsverhalten und die Spezifität der RNA-Aptamere an ihr Zielmolekül zu geben.

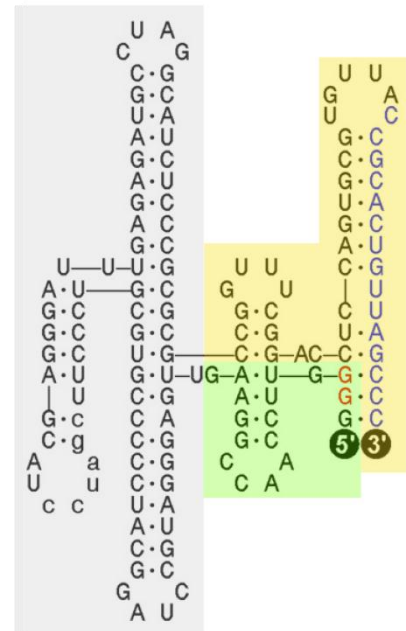


Abb. 36: vermutete Sekundärstruktur der RQ135-RNA, bevorzugtes Templat der Q β -Replikase [115]. Als Primer für die QST40-Bank verwendete Bereiche sind gelb bzw. grün unterlegt.

5.8 Markt- und Patentsituation

Die Hochdurchsatz-Selektion von Aptameren war stets für eine kommerzielle Nutzung vorgesehen. Seit der Erstbeschreibung des SELEX-Verfahrens, vor knapp 20 Jahren durch Tuerk & Gold [114], haben die *in vitro*-Selektionstechnik und die mit ihr gewonnenen Aptamere ihren Stellenwert in der Nukleinsäure-Forschung gefestigt. Dies zeigt u.a. die jährlich steigende Anzahl an Publikationen (s. Abb. 37).

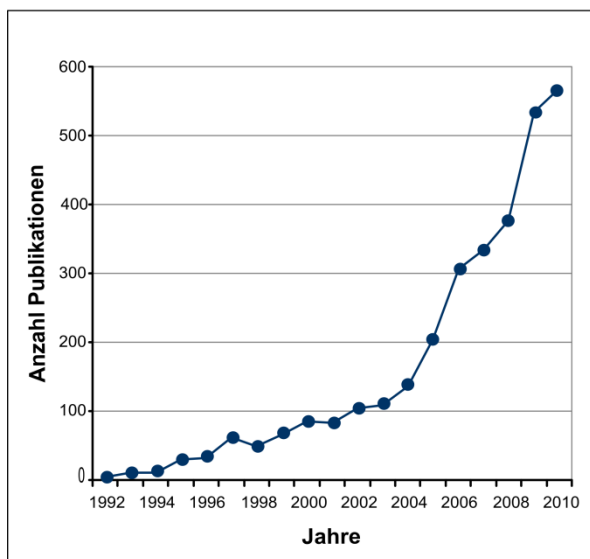


Abb. 37: Wissenschaftliche Relevanz von Aptamere.: Anzahl der in „Pubmed“ veröffentlichten Artikel zu den Suchbegriffen „Aptamere/SELEX“ in den Jahren 1992 bis 2010

Ohne eine Rechtsverletzung ließe sich das 1989 [34] patentierte SELEX-Verfahren in Kürze kommerziell nutzen. Erschwert wird dies jedoch durch zahlreiche Modifikationen und Weiterentwicklungen des Prozesses, die in den letzten zwei Dekaden patentiert worden sind [25]. Zunehmend werden auch Aptamersequenzen, sofern sie einer speziellen Applikation dienen, rechtlich geschützt. Insgesamt sind bereits über 800 Patente aus den Bereichen Therapie und *in vitro*-Diagnostik bekannt [71].

Basierend auf Daten aus Industrie, Forschung und Akademie erstellte das Marktforschungsunternehmen „bcc research“ (USA) im März 2010 eine Marktanalyse für den „Weltmarkt von Aptameren von 2009 - 2014“, (s. Abb. 38) [80]; darin wird von einer jährlichen Wachstumsrate von ca. 55% für den therapeutischen bzw. 124% für den diagnostischen Bereich ausgegangen.

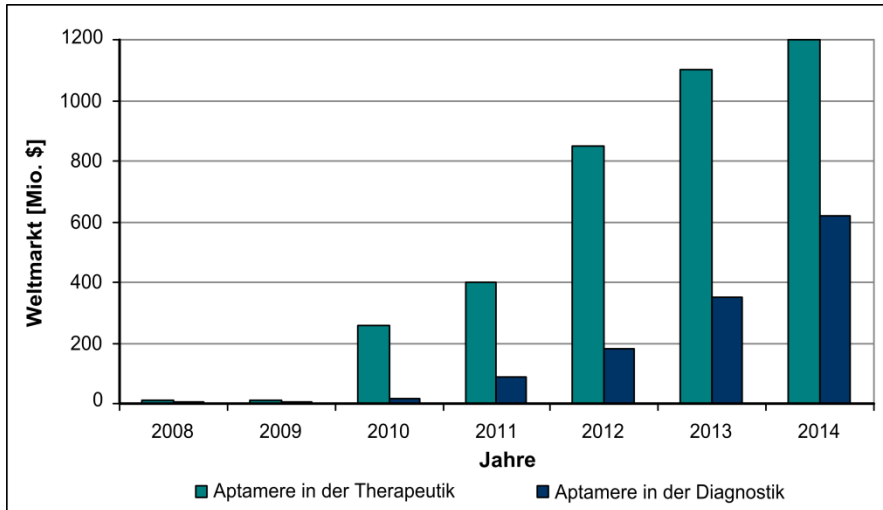


Abb. 38: Marktwirtschaftliche Relevanz von Aptameren: Weltmarkt für Aptamere in Therapeutik und Diagnostik, Berechnungen des Marktforschungsunternehmens „bcc research“.

Derzeit sind nur bei fünf Unternehmen aptamerbasierte Medikamente in Marktvorbereitung/-entwicklung, vermutlich weil Nukleinsäuren immer noch als nicht hinreichend stabil gelten, pharmakokinetische Probleme auftreten können und die Produktion noch vergleichsweise teuer ist [71].

5.9 Anwendungspotenziale und Ausblick

Das SELEX-Verfahren ist in den letzten 20 Jahren vielfach modifiziert und auch optimiert worden [106]. Die Verwendung magnetischer Partikel und die damit verbundene Automatisierung stellt generell die größte Verbesserung dar [105]. Ein auf drei Selektionsrunden verkürztes Verfahren und die Nutzung moderner Hochdurchsatzsequenzierungs-Technologien ermöglichen kosten- und zeiteffizientes Arbeiten [18]. Derart durchgeführte Hochdurchsatzselektionen können als Grundlage für eine Kommerzialisierung des Verfahrens dienen.

Der entwickelte und etablierte Diversitäts-Assay dient der Überwachung des Selektionserfolgs durch die Einschätzung der Diversität über einen mitgeführten Standard [95]. Auch dies ist als ein entscheidender Beitrag zur ressourcensparenden Durchführung von SELEX-Experimenten zu werten.

Für die in dieser Studie selektierten streptavidin-spezifischen DNA-Aptamere konnte eine Anwendung – die Affinitätschromatographie – exemplarisch aufgezeigt werden. Eine breit angelegte Nutzung zur Aufreinigung von rekombinantem Streptavidin oder Fusionsproteinen bedürfte allerdings noch einiger Optimierung. Denkbar wären in dieser Hinsicht Modifikationen,

um die Stabilität gegenüber Nukleasen zu erhöhen [54] oder die Verwendung repetitiver Aptamersequenzen [16]. Zudem könnte die Verwendung von Linkern die immobilisierten Aptamere für das Protein besser zugänglich machen.

Überdies konnte das RNA-SELEX-Verfahren durch Verwendung der Q β -Replikase für die RNA-Amplifikation grundlegend revolutioniert werden. Diese bereits 1990 durch Tuerk & Gold veröffentlichte Methode [114], erwies sich erst in Verbindung mit der *in vitro*-Kompartimentierung (durch Emulsionen [96]) als erfolgreich nutzbar. Das Einsparen der Arbeitsschritte reverse Transkription, PCR und *in vitro*-Transkription sowie die Reduktion auf drei Selektionsrunden durch die Auswertung mittels NGS machen das Verfahren derart effizient, dass es auch für „Screenings“ oder kommerzielle Produkte attraktiv ist.

Eine weitere Methode zur isothermalen RNA-Amplifikation bietet das NASBATM-Verfahren (*Nucleic acid sequence based amplification*) [19]. Hierbei wird einzelsträngige RNA, in entgegengesetzter Orientierung zur Matrizen-RNA, mittels T7-RNA-Polymerase über ein RNA-DNA-Hybrid generiert. Zusätzlich benötigt die Reaktion RNase H und reverse Transkriptase sowie geeignete Primer mit T7-Promotor. Derzeit wird diese Methode hauptsächlich zum Nachweis von Noroviren [72, 81], Hepatitis A-Viren und Rotaviren in Lebensmitteln [45, 46] genutzt. Diese Methode birgt evtl. eine geringere Gefahr der Kontamination und ließe sich daher auch in Kombination mit Emulsionen für den SELEX-Prozess einsetzen.

Die Durchführung des SELEX-Prozesses im Hochdurchsatz mit der anschließenden Einbindung moderner Sequenzieretechnologien hat zu einer „Weitung des Flaschenhalses“ geführt. Entgegen herkömmlichen Protokollen, bei denen am Ende nur sehr wenige Klone getestet werden konnten, liefert das neue Verfahren sehr große Sequenzdatensätze, die es zu testen gilt. Einen möglichen Ansatz hierfür könnte die microarraybasierte Synthesetechnologie liefern, sie würde die parallele Testung von mehr als 10.000 Klonen erlauben.

6. Zusammenfassung

Der SELEX-Prozess zur Selektion funktioneller Nukleinsäuren (hier: Aptamere) ist, obgleich mittlerweile vielfach modifiziert, noch immer ein zeit- und damit kostenintensives Verfahren.

Eine parallele Selektion von DNA-Aptameren in 10 Runden gegen Streptavidin wurde halbautomatisiert, und zunächst nach herkömmlichen Protokollen (Klonierung, Sanger-Sequenzierung), durchgeführt und anschließend mithilfe einer massiv parallelen Sequenzierungstechnologie (*next-generation sequencing*) aller Runden eingehender analysiert. Auf drei Runden reduzierte und optimierte SELEX-Protokolle wurden für zwei weitere Streptavidin-Aptamer-Selektionen im Zuge dieser Arbeit entwickelt, die möglichen Binder über *next-generation sequencing* identifiziert. Angereicherte Sequenzen sind in geeigneten Bindungsstudien in der Form von vollsynthetischen Oligonukleotiden hinsichtlich ihrer Zielmolekül-Affinität charakterisiert worden.

Im Hinblick auf eine mögliche kommerzielle Verwertbarkeit wurde die Affinitätschromatographie von rekombinanten Streptavidin und eines Fusionsproteins als beispielhafte Anwendung von Aptameren in der Biotechnologie gewählt.

Amplifikationsreaktionen besonders hoch diverser Nukleinsäuregemische, wie sie bei SELEX-Experimenten zum Einsatz kommen, bergen das Risiko der Artefaktentstehung. Die *in vitro*-Kompartimentierung der PCR durch Wasser-in-Öl-Emulsionen erlaubte hingegen eine nahezu klonale Amplifikation ohne Artefakte.

Eine Optimierung des RNA-SELEX-Prozesses erfolgte durch die Verwendung der Q β -Replikase zur isothermalen RNA-Amplifikation. Üblicherweise auftretende Kontaminationen wurden durch das Emulgieren (Wasser-in-Öl-Emulsionen) der Reaktionen verhindert. Hierdurch konnten die zeitaufwendigen Arbeitsschritte reverse Transkription, PCR und *in vitro*-Transkription eingespart werden.

Der Flaschenhals von der parallelen SELEX über Einzelklonsequenzierung, Sequenzauswertung und der Bindungsstudien einzelner Klone konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit erfolgreich geweitet werden. Hinsichtlich der zielgerichteten Generierung von Aptameren werden nachfolgende Studien sicherlich von den gewonnenen Erkenntnissen profitieren können.

7. Summary

The SELEX process for the selection of functional nucleic acids (here: aptamers) is, although frequently modified, still a time and therefore cost-intensive process.

A parallel and semiautomated selection of DNA aptamers in 10 rounds against Streptavidin was first conducted according to conventional protocols (cloning, Sanger sequencing), and then, using massively parallel sequencing (next-generation sequencing), all rounds were more thoroughly analysed. Once optimized and reduced to three rounds, the SELEX protocol was applied for two additional Streptavidin aptamer selections. Possible binders were identified via next-generation sequencing. Enriched sequences, in the form of fully synthetic oligonucleotides, were characterized with regard to their target molecule affinity in appropriate binding studies.

Affinity chromatography of recombinant streptavidin and a fusion protein was chosen to exemplify the biotechnological application of aptamers with a view to possible commercial use.

Amplification reactions of particularly highly diverse nucleic acid mixtures, as they are used in SELEX experiments, carry the risk of the generation of artifacts. However, *in vitro* compartmentalization of PCR by water in oil emulsions, allowed an almost clonal amplification without artifacts.

An optimization of the RNA SELEX process was carried out using the Q β Replicase for isothermal RNA amplification. Commonly occurring contaminants were avoided using water-in-oil-emulsion reactions. This allowed time consuming steps like reverse transcription, PCR and *in vitro* transcription to be by-passed.

The bottleneck of parallelized SELEX, via single clone sequencing, sequence analysis and binding studies of individual clones, could be successfully ameliorated by the results of this work. Subsequent studies regarding the targeted generation of aptamers will certainly benefit from the acquired knowledge.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Bailey, T.L. und Elkan, C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / ..International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 2, (1994), 28-36.
- [2] Baldrich, E., Restrepo, A. und O'Sullivan, C.K. 2004. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Analytical Chemistry*. 76, 23 (Dez. 2004), 7053-7063.
- [3] Baldrich, E., Restrepo, A. und O'Sullivan, C.K. 2004. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Analytical Chemistry*. 76, 23 (Dez. 2004), 7053-7063.
- [4] Baum, P.D. und McCune, J.M. 2006. Direct measurement of T-cell receptor repertoire diversity with AmpliCot. *Nature Methods*. 3, 11 (Nov. 2006), 895-901.
- [5] Bell, S.D., Denu, J.M., Dixon, J.E. und Ellington, A.D. 1998. RNA molecules that bind to and inhibit the active site of a tyrosine phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 273, 23 (Juni. 1998), 14309-14314.
- [6] Berens, C., Thain, A. und Schroeder, R. 2001. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9, 10 (Okt. 2001), 2549-2556.
- [7] Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M.G., Reyes, G.B., Gonzalez Solveyra, C. und Santa-Coloma, T.A. 2001. Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *Journal of Immunological Methods*. 252, 1-2 (Juni. 2001), 191-197.
- [8] Biebricher, C.K., Eigen, M. und Luce, R. 1981. Kinetic analysis of template-instructed and de novo RNA synthesis by Q beta replicase. *Journal of Molecular Biology*. 148, 4 (Juni. 1981), 391-410.
- [9] Bing, T., Yang, X., Mei, H., Cao, Z. und Shangguan, D. 2010. Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18, 5 (März. 2010), 1798-1805.
- [10] Bittker, J.A., Le, B.V. und Liu, D.R. 2002. Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nature Biotechnology*. 20, 10 (Okt. 2002), 1024-1029.
- [11] Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. und Toole, J.J. 1992. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. 355, 6360 (Feb. 1992), 564-566.
- [12] Britten, R.J. und Kohne, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science (New York, N.Y.)*. 161, 841 (Aug. 1968), 529-540.
- [13] Bruno, J.G. und Kiel, J.L. 2002. Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods. *BioTechniques*. 32, 1 (Jan. 2002), 178-180, 182-183.
- [14] Burmeister, P.E., Wang, C., Killough, J.R., Lewis, S.D., Horwitz, L.R., Ferguson, A., Thompson, K.M., Pendergrast, P.S., McCauley, T.G., Kurz, M., Diener, J., Cload, S.T., Wilson, C. und Keefe, A.D. 2006. 2'-Deoxy purine, 2'-O-methyl pyrimidine (dRmY) aptamers as candidate therapeutics. *Oligonucleotides*. 16, 4 (2006), 337-351.
- [15] Charlton, J. und Smith, D. 1999. Estimation of SELEX pool size by measurement of DNA renaturation rates. *RNA (New York, N.Y.)*. 5, 10 (Okt. 1999), 1326-1332.
- [16] Cheglakov, Z., Weizmann, Y., Braunschweig, A.B., Wilner, O.I. und Willner, I. 2008. Increasing the complexity of periodic protein nanostructures by the rolling-circle-amplified synthesis of aptamers. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 47, 1 (2008), 126-130.
- [17] Chetverin, A.B., Kopein, D.S., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A. und Ugarov, V.I. 2005. Viral RNA-directed RNA polymerases use diverse mechanisms to promote recombination between RNA molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 10 (März. 2005), 8748-8755.
- [18] Cho, M., Xiao, Y., Nie, J., Stewart, R., Csordas, A.T., Oh, S.S., Thomson, J.A. und Soh, H.T. 2010. Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-

- throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 35 (Aug. 2010), 15373-15378.
- [19] Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 350, 6313 (März. 1991), 91-92.
- [20] Cox, J.C. und Ellington, A.D. 2001. Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9, 10 (Okt. 2001), 2525-2531.
- [21] Cox, J.C., Rudolph, P. und Ellington, A.D. 1998. Automated RNA selection. *Biotechnology Progress*. 14, 6 (Dez. 1998), 845-850.
- [22] Daniels, D.A., Chen, H., Hicke, B.J., Swiderek, K.M. und Gold, L. 2003. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 26 (Dez. 2003), 15416-15421.
- [23] DeStefano, J.J. 1994. Kinetic analysis of the catalysis of strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Journal of Molecular Biology*. 243, 4 (Nov. 1994), 558-567.
- [24] Drolet, D.W., Moon-McDermott, L. und Romig, T.S. 1996. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nature Biotechnology*. 14, 8 (Aug. 1996), 1021-1025.
- [25] Dua, P., Kim, S. und Lee, D.-K. 2008. Patents on SELEX and therapeutic aptamers. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. 2, 3 (2008), 172-186.
- [26] Ellington, A.D. und Szostak, J.W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 346, 6287 (Aug. 1990), 818-822.
- [27] Eulberg, D., Buchner, K., Maasch, C. und 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 Research*. 33, 4 (2005), e45.
- [28] Eydeler, K., Magbanua, E., Werner, A., Ziegelmeüller, P. und Hahn, U. 2009. Fluorophore binding aptamers as a tool for RNA visualization. *Biophysical Journal*. 96, 9 (Mai. 2009), 3703-3707.
- [29] Famulok, M., Mayer, G. und Blind, M. 2000. Nucleic Acid Aptamers From Selection in Vitro to Applications in Vivo. *Acc. Chem. Res*. 33, 9 (2000), 591-599.
- [30] Fan, P., Suri, A.K., Fiala, R., Live, D. und Patel, D.J. 1996. Molecular recognition in the FMN-RNA aptamer complex. *Journal of Molecular Biology*. 258, 3 (Mai. 1996), 480-500.
- [31] Gilbert, D.E. und Feigon, J. 1999. Multistranded DNA structures. *Current Opinion in Structural Biology*. 9, 3 (Juni. 1999), 305-314.
- [32] Gilbert, J.C., DeFeo-Fraulini, T., Hutabarat, R.M., Horvath, C.J., Merlino, P.G., Marsh, H.N., Healy, J.M., Boufakhreddine, S., Holohan, T.V. und Schaub, R.G. 2007. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*. 116, 23 (Dez. 2007), 2678-2686.
- [33] Glökler, J., Schütze, T. und Konthur, Z. 2010. Automation in the high-throughput selection of random combinatorial libraries--different approaches for select applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 15, 4 (Apr. 2010), 2478-2490.
- [34] Gold L, Tuerk, C.: EP0533838 (1991). .
- [35] Gold, L. 1995. The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds. *Harvey Lectures*. 91, (1996. 1995), 47-57.
- [36] Grate, D. und Wilson, C. 1999. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 11 (Mai. 1999), 6131-6136.
- [37] Green, N.M. 1990. Avidin and streptavidin. *Methods in Enzymology*. 184, (1990), 51-67.
- [38] Griffiths, A.D. und Tawfik, D.S. 2006. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends in Biotechnology*. 24, 9 (Sep. 2006), 395-402.
- [39] Hermann, T. und Patel, D.J. 2000. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science (New York, N.Y.)*. 287, 5454 (Feb. 2000), 820-825.
- [40] Higuchi, R.G. und Ochman, H. 1989. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. 17, 14 (Juli. 1989), 5865.
- [41] Holton, T.A. und Graham, M.W. 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*. 19, 5 (März. 1991), 1156.
- [42] Huizenga, D.E. und Szostak, J.W. 1995. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 34, 2 (Jan. 1995), 656-665.

- [43] Human Genome Sequencing Consortium International 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431, 7011 (Okt. 2004), 931-945.
- [44] Jayasena, S.D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*. 45, 9 (Sep. 1999), 1628-1650.
- [45] Jean, J., Blais, B., Darveau, A. und Fliss, I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 12 (Dez. 2001), 5593-5600.
- [46] Jean, J., Blais, B., Darveau, A. und Fliss, I. 2002. Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system. *Journal of Virological Methods*. 105, 1 (Aug. 2002), 123-132.
- [47] Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. und Polisky, B. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*. 263, 5152 (März. 1994), 1425-1429.
- [48] Jones, M.D. und Foulkes, N.S. 1989. Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*. 17, 20 (Okt. 1989), 8387-8388.
- [49] Joyce, G.F. 2007. Forty years of in vitro evolution. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 46, 34 (2007), 6420-6436.
- [50] Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R. und Spiegelman, S. 1972. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 69, 10 (Okt. 1972), 3038-3042.
- [51] Kamen, R.I., Monstein, H.J. und Weissmann, C. 1974. The host factor requirement of Qbeta RNA replicase. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 366, 3 (Okt. 1974), 292-299.
- [52] Kapust, R.B. und Waugh, D.S. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 8, 8 (Aug. 1999), 1668-1674.
- [53] Kato, Y., Minakawa, N., Komatsu, Y., Kamiya, H., Ogawa, N., Harashima, H. und Matsuda, A. 2005. New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX. *Nucleic Acids Research*. 33, 9 (2005), 2942-2951.
- [54] Keefe, A.D. und Cload, S.T. 2008. SELEX with modified nucleotides. *Current Opinion in Chemical Biology*. 12, 4 (Aug. 2008), 448-456.
- [55] Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A. und Fürste, J.P. 1996. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature Biotechnology*. 14, 9 (Sep. 1996), 1112-1115.
- [56] Kopsidas, G., Carman, R.K., Stutt, E.L., Raicevic, A., Roberts, A.S., Siomos, M.-A.V., Dobric, N., Pontes-Braz, L. und Coia, G. 2007. RNA mutagenesis yields highly diverse mRNA libraries for in vitro protein evolution. *BMC Biotechnology*. 7, (2007), 18.
- [57] Kusser, W. 2000. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *Journal of Biotechnology*. 74, 1 (März. 2000), 27-38.
- [58] Lamla, T. und Erdmann, V.A. 2004. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 33, 1 (Jan. 2004), 39-47.
- [59] Lim, T.S., Schütze, T., Lehrach, H., Glökler, J. und Konthur, Z. 2011. Diversity visualization by endonuclease: a rapid assay to monitor diverse nucleotide libraries. *Analytical Biochemistry*. 411, 1 (Apr. 2011), 16-21.
- [60] Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. und Strehlitz, B. 2005. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338, 4 (Dez. 2005), 1928-1934.
- [61] Mardis, E.R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics: TIG*. 24, 3 (März. 2008), 133-141.
- [62] Marshall, K.A. und Ellington, A.D. 2000. In vitro selection of RNA aptamers. *Methods in Enzymology*. 318, (2000), 193-214.
- [63] Maynard, J.A., Lindquist, N.C., Sutherland, J.N., Lesuffleur, A., Warrington, A.E., Rodriguez, M. und Oh, S.-H. 2009. Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins. *Biotechnology Journal*. 4, 11 (Nov. 2009), 1542-1558.
- [64] MEME Suite - Introduction: http://meme.sdsc.edu/meme4_6_1/intro.html. Accessed: 2011-11-16.
- [65] Mendonsa, S.D. und Bowser, M.T. 2004. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*. 126, 1 (Jan. 2004), 20-21.

- [66] Mendonsa, S.D. und Bowser, M.T. 2005. In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*. 127, 26 (Juli. 2005), 9382-9383.
- [67] Mendonsa, S.D. und Bowser, M.T. 2004. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 76, 18 (Sep. 2004), 5387-5392.
- [68] Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*. 11, 1 (Jan. 2010), 31-46.
- [69] Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. und Uhlenbeck, O.C. 1987. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research*. 15, 21 (Nov. 1987), 8783-8798.
- [70] Mills, D.R., Peterson, R.L. und Spiegelman, S. 1967. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 58, 1 (Juli. 1967), 217-224.
- [71] Missailidis, S. und Hardy, A. 2009. Aptamers as inhibitors of target proteins. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 19, 8 (Aug. 2009), 1073-1082.
- [72] Moore, C., Clark, E.M., Gallimore, C.I., Corden, S.A., Gray, J.J. und Westmoreland, D. 2004. Evaluation of a broadly reactive nucleic acid sequence based amplification assay for the detection of noroviruses in faecal material. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 29, 4 (Apr. 2004), 290-296.
- [73] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51 Pt 1, (1986), 263-273.
- [74] Myers, T.W. und Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 30, 31 (Aug. 1991), 7661-7666.
- [75] Naimuddin, M., Kitamura, K., Kinoshita, Y., Honda-Takahashi, Y., Murakami, M., Ito, M., Yamamoto, K., Hanada, K., Husimi, Y. und Nishigaki, K. 2007. Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library. *Journal of Molecular Recognition: JMR*. 20, 1 (Feb. 2007), 58-68.
- [76] Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R. und Adamis, A.P. 2006. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5, 2 (Feb. 2006), 123-132.
- [77] Nieuwlandt, D., Wecker, M. und Gold, L. 1995. In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*. 34, 16 (Apr. 1995), 5651-5659.
- [78] Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Pänke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stöcklein, W., Dahmen, C., Pauli, G. und Kage, A. 2007. One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnology*. 7, (2007), 48.
- [79] Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V.A. und Fürste, J.P. 1996. Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature Biotechnology*. 14, 9 (Sep. 1996), 1116-1119.
- [80] Nucleic Acid Aptamers for Diagnostics and Therapeutics: Global Markets - BIO071A: <http://www.bccresearch.com/report/nucleic-acid-aptamers-bio071a.html>. Accessed: 2011-11-16.
- [81] Patterson, S.S., Smith, M.W., Casper, E.T., Huffman, D., Stark, L., Fries, D. und Paul, J.H. 2006. A nucleic acid sequence-based amplification assay for real-time detection of norovirus genogroup II. *Journal of Applied Microbiology*. 101, 4 (Okt. 2006), 956-963.
- [82] Performance Specifications: http://www.illumina.com/support/sequencing/sequencing_instruments/hiseq_2000/performance_specifications.ilmn. Accessed: 2011-11-16.
- [83] Petersen, M. und Wengel, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in Biotechnology*. 21, 2 (Feb. 2003), 74-81.
- [84] Raddatz, M.-S.L., Dolf, A., Endl, E., Knolle, P., Famulok, M. und Mayer, G. 2008. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 47, 28 (2008), 5190-5193.
- [85] Rimmele, M. 2003. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*. 4, 10 (Okt. 2003), 963-971.
- [86] Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. und Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 245, 2 (Feb. 1997), 154-160.

- [87] Robertson, D.L. und Joyce, G.F. 1990. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*. 344, 6265 (März. 1990), 467-468.
- [88] Rothberg, J.M. u. a. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 475, 7356 (Juli. 2011), 348-352.
- [89] Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L. und Janjić, 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 273, 32 (Aug. 1998), 20556-20567.
- [90] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*. 239, 4839 (Jan. 1988), 487-491.
- [91] Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74, 12 (Dez. 1977), 5463-5467.
- [92] Schaerli, Y. und Hollfelder, F. 2009. The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology. *Molecular bioSystems*. 5, 12 (Dez. 2009), 1392-1404.
- [93] Schmidt, T.G. und 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 Engineering*. 6, 1 (Jan. 1993), 109-122.
- [94] Schmidt, T.G., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *Journal of Molecular Biology*. 255, 5 (Feb. 1996), 753-766.
- [95] Schütze, T., Arndt, P.F., Menger, M., Wochner, A., Vingron, M., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Kaps, C. und Glökler, J. 2010. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO--a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 38, 4 (März. 2010), e23.
- [96] Schütze, T., Rubelt, F., Repkow, J., Greiner, N., Erdmann, V.A., Lehrach, H., Konthur, Z. und Glökler, J. 2011. A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical Biochemistry*. 410, 1 (März. 2011), 155-157.
- [97] Shaffer, A.L., Wojnar, W. und Nelson, W. 1990. Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. 190, 2 (Nov. 1990), 292-296.
- [98] Sidhu, S.S. 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 6 (Dez. 2000), 610-616.
- [99] Smith, G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*. 228, 4705 (Juni. 1985), 1315-1317.
- [100] Sooter, L.J. und Ellington, A.D. 2002. Reflections on a novel therapeutic candidate. *Chemistry & Biology*. 9, 8 (Aug. 2002), 857-858.
- [101] Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U. und Mortensen, K.K. 2003. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expression and Purification*. 32, 2 (Dez. 2003), 252-259.
- [102] Stein, C.A. 1996. Exploiting the potential of antisense: beyond phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Chemistry & Biology*. 3, 5 (Mai. 1996), 319-323.
- [103] Stein, L.D. 2010. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biology*. 11, 5 (2010), 207.
- [104] Stojanovic, M.N., de Prada, P. und Landry, D.W. 2001. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *Journal of the American Chemical Society*. 123, 21 (Mai. 2001), 4928-4931.
- [105] Stoltenburg, R., Reinemann, C. und Strehlitz, B. 2005. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383, 1 (Sep. 2005), 83-91.
- [106] Stoltenburg, R., Reinemann, C. und Strehlitz, B. 2007. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*. 24, 4 (Okt. 2007), 381-403.

- [107] Stoltenburg, R., Reinemann, C. und Strehlitz, B. 2007. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*. 24, 4 (Okt. 2007), 381-403.
- [108] Strehlitz, B., Nikolaus, N. und Stoltenburg, R. 2008. Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors*. 8, 7 (Juli. 2008), 4296-4307.
- [109] Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*. 185, (1990), 60-89.
- [110] Tang, J., Xie, J., Shao, N. und Yan, Y. 2006. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*. 27, 7 (Apr. 2006), 1303-1311.
- [111] Tawfik, D.S. und Griffiths, A.D. 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*. 16, 7 (Juli. 1998), 652-656.
- [112] Tindall, K.R. und Kunkel, T.A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 27, 16 (Aug. 1988), 6008-6013.
- [113] Tombelli, S., Minunni, M. und Mascini, M. 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosensors & Bioelectronics*. 20, 12 (Juni. 2005), 2424-2434.
- [114] Tuerk, C. und Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*. 249, 4968 (Aug. 1990), 505-510.
- [115] Ugarov, V.I. und Chetverin, A.B. 2008. Functional circularity of legitimate Qbeta replicase templates. *Journal of Molecular Biology*. 379, 3 (Juni. 2008), 414-427.
- [116] Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J.M. und Colli, W. 2002. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 23 (Juni. 2002), 20756-20762.
- [117] Urabe, H., Ichihashi, N., Matsuura, T., Hosoda, K., Kazuta, Y., Kita, H. und Yomo, T. 2010. Compartmentalization in a water-in-oil emulsion repressed the spontaneous amplification of RNA by Q beta replicase. *Biochemistry*. 49, 9 (März. 2010), 1809-1813.
- [118] Voss, S. und 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 Engineering*. 10, 8 (1997), 975 -982.
- [119] Walder, R.Y., Hayes, J.R. und Walder, J.A. 1993. Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences. *Nucleic Acids Research*. 21, 18 (Sep. 1993), 4339-4343.
- [120] Wang, C., Yang, G., Luo, Z. und Ding, H. 2009. In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*. 41, 4 (Apr. 2009), 335-340.
- [121] Wang, Y. und Rando, R.R. 1995. Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chemistry & Biology*. 2, 5 (Mai. 1995), 281-290.
- [122] Watson, S.R., Chang, Y.F., O'Connell, D., Weigand, L., Ringquist, S. und Parma, D.H. 2000. Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. 10, 2 (Apr. 2000), 63-75.
- [123] Wiegand, T.W., Williams, P.B., Dreskin, S.C., Jouvin, M.H., Kinet, J.P. und Tasset, D. 1996. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 157, 1 (Juli. 1996), 221-230.
- [124] Williams, K.P. und Bartel, D.P. 1995. PCR product with strands of unequal length. *Nucleic Acids Research*. 23, 20 (Okt. 1995), 4220-4221.
- [125] Williams, R., Peisajovich, S.G., Miller, O.J., Magdassi, S., Tawfik, D.S. und Griffiths, A.D. 2006. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nature Methods*. 3, 7 (Juli. 2006), 545-550.
- [126] Wlotzka, B., Leva, S., Eschgfäller, B., Burmeister, J., Kleinjung, F., Kaduk, C., Muhn, P., Hess-Stumpp, H. und Klussmann, S. 2002. In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 13 (Juni. 2002), 8898-8902.
- [127] Wochner, A. und Glöckler, J. 2007. Nonradioactive fluorescence microtiter plate assay monitoring aptamer selections. *BioTechniques*. 42, 5 (Mai. 2007), 578, 580, 582.

- [128] Wochner, A., Cech, B., Menger, M., Erdmann, V.A. und Glökler, J. 2007. Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling. *BioTechniques*. 43, 3 (Sep. 2007), 344, 346, 348 passim.
- [129] Wochner, A., Menger, M., Orgel, D., Cech, B., Rimmele, M., Erdmann, V.A. und Glökler, J. 2008. A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Analytical Biochemistry*. 373, 1 (Feb. 2008), 34-42.
- [130] Woollard, P.M., Mehta, N.A.L., Vamathevan, J.J., Van Horn, S., Bonde, B.K. und Dow, D.J. 2011. The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discovery Today*. 16, 11-12 (Juni. 2011), 512-519.
- [131] Wu, L. und Curran, J.F. 1999. An allosteric synthetic DNA. *Nucleic Acids Research*. 27, 6 (März. 1999), 1512 -1516.
- [132] Xu, W. und Ellington, A.D. 1996. Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 15 (Juli. 1996), 7475-7480.
- [133] Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*. 31, 13 (Juli. 2003), 3406-3415.
- [134] <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>. Accessed: 2011-11-16.

9. Anhang

Tab. A1: KingFisher-Protokoll für die erste Streptavidin-SELEX in 10 Runden

Runde	Platte	Aktion	Zeit [min]	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads
1	1	Release	00:10	slow	5×
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Bind	00:15	bottom medium	
	2	Wash	00:10	bottom slow	5×
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	00:15	bottom medium	
	3	Elution	30:00	medium	8×
2	1	Release	00:10	slow	5×
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Bind	00:15	bottom medium	
	2	Wash	00:10	bottom slow	5×
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom slow	
3,4,5,6,7,8	1	Release	00:10	slow	5×
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	07:00	very slow	
		Bind	00:15	bottom medium	
	2	Wash	00:10	bottom slow	5×
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom slow	
	3	Wash	00:10	bottom slow	5×
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom slow	
9,10	1	Release	00:10	slow	5×
		Mix	03:30	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	03:30	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	03:30	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
Mix	03:30	very slow			

		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	03:30	very slow	
		Mix	00:15	bottom medium	
		Mix	03:30	very slow	
		Bind	00:15	bottom medium	5×
	2	Wash	00:10	bottom slow	
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom medium	5×
	3	Wash	00:10	bottom slow	
		Wash	03:00	slow	
		Mix	00:15	bottom medium	

Tab. A2: KingFisher-Protokoll für die zweite Streptavidin-SELEX in 3 Runden

Runde	Platte	Aktion	Zeit [min]	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads
1	1	Release	00:10	slow	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	17:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		5×
	2	Release	00:10	bottom mix	
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	3	Release	00:10	bottom mix	
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	4	Elution (94°C)	10:00	medium	
		Bind	00:10		
2	1	Release	00:10	slow	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	08:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		5×
	2	Release	00:10	bottom mix	
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	3	Release	00:10	bottom mix	
		Wash	00:10	bottom mix	

	2	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix	5x
	3	Elution (60°C) Bind	06:00 00:10	medium	3x
2	1	Release Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Bind	00:10 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:10	slow slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix	5x
	2	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix	5x
	3	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix very slow	5x
	5	Elution (60°C) Bind	10:00 00:10	medium	3x
3	1	Release Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Mix Bind	00:10 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 00:10	slow slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix slow bottom mix bottom mix	5x
	2	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	3	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	4	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	6	Elution (60°C) Bind	10:00 00:10	medium	3x

Tab. A4: KingFisher-Protokoll für die „Small molecuels“-SELEX in 3 Runden

Runde	Platte	Aktion	Zeit [min]	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads
1	1	Release	00:10	slow	5x
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
Bind	00:10				
	2	Release	00:10	bottom mix	5x
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	3	Release	00:10	bottom mix	5x
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	4	Elution (70°C)	10:00	medium	3x
		Bind	00:10		
2	1	Release	00:10	slow	5x
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
Bind	00:10				
	2	Release	00:10	bottom mix	5x
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10		
	3	Release	00:10	bottom mix	5x
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10	very slow	
	4	Release	00:10	bottom mix	5x
		Wash	00:10	bottom mix	
		Mix	05:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Bind	00:10	bottom slow	
	5	Elution (70°C)	10:00	medium	3x
		Bind	00:10		
3	1	Release	00:10	slow	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	
		Mix	00:15	bottom mix	
		Mix	06:00	slow	

		Mix Mix Mix Mix Mix Bind	00:15 06:00 00:15 06:00 00:15 00:10	bottom mix slow bottom mix slow bottom mix	5x
	2	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	3	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	4	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	5	Release Wash Mix Mix Bind	00:10 00:10 05:00 00:15 00:10	bottom mix bottom mix slow bottom mix bottom slow	5x
	6	Elution (70°C) Bind	10:00 00:10	medium	3x

Tab A5: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung der Streptavidin-SELEX in 10 Runden

Klon	Sequenz	Consensusmotiv
1	5'-AAT AGC CCC CTG ACG CAA GGG TTA GAG CAG TAA TCA CGTT	1.1
2	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
3	5'-AAT AGC CCC CTG ACG CAA GGG TTA GAG CAG TAA TCA CGT T	1.1
4	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
5	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
6	5'-CGG GTT CAC CGT TGC GTC ACG GGG CAA TTC ACC ACT CGC C	3
7	kein Insert	
8	5'-ACT TTA GGG CTA ACC TGC GAT CGG TGC GTA CCC CAT GCT C	4
9	5'-ACC AGA ACG CAC CGA TCG CAG GTT TCT GTG AGC AGG GGG	5
10	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG TTA CTT T	6.1
11	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
12	5'-GTG TAG GAT CAT CGC CCC CAC GAC GCA GTG GGT GAT CGT A	7
13	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
14	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
15	5'-CGG GTT CAC CGT TGC GTC ACG GGG CAA TTC ACC ACT CGC C	3
16	5'-GAC TCC GGG ACA TGC CCA TGT CGC AAT GGT GGC CCG GAT T	2
17	5'-GTG TAG GAT CAT CGC CCC CAC GAC GCA GTG GGT GAT CGT A	7
18	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG ATA CTT T	6.2
19	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG TTA CTT T	6.1
20	5'-CGG GTT CAC CGT TGC GTC ACG GGG CAA TTC ACC ACT CGC C	3
21	5'-GTG TAG GAT CAT CGC CCC CAC GAC GCA GTG GGT GAT CGT A	7
22	5'-CAC GCG ACC GGC GCA GGT CTG AGG GCA GGC CCA GTA ATA T	8
23	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG TTA CTT T	6.1
24	5'-ATA AGC ACG CCA GGG ACT ATG ACA CCG TAC CTG CTC T	9
25	5'-AAT AGC CCC CTG ACG CAA GGG TTA GAG CAG TAA TCA TGG T	1.2

Tab. A6: chemisch synthetisierte und getestete Einzelklone potenzieller Streptavidin-Binder, identifiziert nach der Sanger-Sequenzierung

Name	Sequenzen
S1C8a	5'-GAG CAT GGG GTA CGC ACC GAT CGC AGG TTA GCC CTA AAG T
S1C9s	5'-ACC AGA ACG CAC CGA TCG CAG GTT TCT GTG AGC AGG GGG
S1C10	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG TTA CTT T
S1C18	5'-ATC TCC GAT TGC CCC ACG ACG CAG TGG TCG GAG ATA CTT T

Tab. A7: Ergebnis der Solexa Sequenzierung der ersten Streptavidin-SELEX in 10 Runden, Top 20 aller Selektionsrunden

Runde	Häufigkeit	Anteil am Pool dieser Runde	Sequenz	Klon
0 (Bank40)	2	0%	5'-AAAGGTAGCACCCTGGGTGTACACGGGACTACACTCCTA	
	2	0%	5'-TGCCGGCCTCGCCGAAAACCTCTGGGACAAATGCGAGG	
	2	0%	5'-GGGTGAGCACATCTTGGCTTCTTGATTGGAGACAGTTCC	
	2	0%	5'-CGATGATATTATACTAGTGTGCATACTTAGTATCGCTAC	
	2	0%	5'-TAATTAATTTAGTATTGTATGAAGTCACAAGTATACTATT	
	2	0%	5'-TTTTTCGAATGTACGTTCTTTTGTGTTAGCACATTAAGA	
	2	0%	5'-TTCATTATCAAGATGCCGAACCGTCTGCTGCCAGGCC	
	2	0%	5'-TTGAGGTAGAGGATCGTAGATTTCTCGGGCAGGCATTGT	
	2	0%	5'-TTTAGATCCTTTATTTCTATAGATTATCCGGGATTTACAT	
	2	0%	5'-ACACGGTAACTACTATCCTGGAGCGGGCAGTTCGGACTG	
	2	0%	5'-CTTCGAGTTGTCTACGCCGATGAAATTTCTGTGTTGT	
	2	0%	5'-GGCGTCCAGGGTTCGAGGTCTCCTGACGTTACAGTTAGGC	
	2	0%	5'-TCATCATACTATCTCATTCTTCGCCAATCCCGTTTTTC	
	2	0%	5'-TTTGGTTTTGTCTCTGGATCTAATGTTCTATATCACGTA	
	2	0%	5'-TCATTTGTTATTGACGCTTTCTCGCACGAGAGTGAGAAA	
	2	0%	5'-TATGTGAAGTTCATCCGCGTTTAAACGGGGACCAAGCGCCT	
	2	0%	5'-TGCCCCAGTTCAATCGGGGCCGTGACTCGTCTGCTGAGT	
	2	0%	5'-TATCACTCTGTGCGGATGCCAGAAAGCATAGTGACCCG	
	2	0%	5'-ATTGTTAATCTATAAAGCGGTAGACTCACTAATTTTCGATG	
	2	0%	5'-CATTTTTTAAATTTGGGTTTGGCCAGTAGTAAATTTGATGTC	
1	7	0%	5'-ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTCCGAGATACTTT	S1C18
	4	0%	5'-CAGGTGATTTGCCACGAGAGTCATACAGTCCCTGTGTGGG	
	2	0%	5'-GACGCCAGGGCGTGTGTGCCCTGAGATGTCACCAGGGAGTGC	
	2	0%	5'-AGTACCTGTCAGAGTAGATTCGCGATGGTATCAAGATGCG	
	2	0%	5'-ACGGTTATAGGGAGTCTGTCTGGTTTTGAAGTGGTATCAC	
	2	0%	5'-TGGACCTGTCTCGCGGGCGTCTGAATTGTTATTTTGGCCG	
	2	0%	5'-GATTCAACGCCGTTTTCGGTTTGAAGTACCCGGGATCCCA	
	2	0%	5'-CCACGCTTGGGGACATAACCATGAATGGGTATGCTGTCCA	
	2	0%	5'-TGTTTTCGCCTTGTCTTTCGCGCCTTCCCTCCGAGGGTGAT	
	2	0%	5'-GCGCAATCTCTGATCGACCAGGAGGGAGCGAAACATGGTG	
	2	0%	5'-GTTATTTTGTAGTCTTCCAGATAATTTCACTTCTGTTG	
	2	0%	5'-GGCTGGGTACATCGGAAAGGTAAGTCTTACGCTCAGTCC	
	2	0%	5'-GAATCCCGCGTGACCAATTACGCTGGATGCCGAGTGCC	
	2	0%	5'-CATGGCGCAGTTCGTGGGGCCATGGAGTCTCACGCAGTG	
	2	0%	5'-GGGGGGCAACCCACGGGGACGTTAGACAGCCTCGGCTAA	
	2	0%	5'-CTGTGCCTGTTTGTCAACATTAGGGATGATTCGGTGACAC	
2	0%	5'-TAATAGCGCTTCCGGTCAGGGCCTTAAACTGACCGCGGA		
2	0%	5'-ATATGGACCTTTCCACCACCCTGTAATCATTTCCCGT		
2	0%	5'-AGGCGACACAAGCCGATGCCCTAACTCGTTACCGTGCCT		
2	0%	5'-TAGTACTTCCCGTTTCTGGGTTTGTAACTTCCCTCCCGT		
2	47	0%	5'-CGAGCTCAGCTAGGTACTACGCCCGTGGTGCAGGGTCAT	S1C10
	30	0%	5'-GGACCTAAGGGCTACGTGTCAACAGGCCGCCGCAAGTG	
	28	0%	5'-CAGGTGATTTGCCACGAGAGTCATACAGTCCCTGTGTGGG	
	27	0%	5'-ATCTCCGATTTGCCACGAGAGTCATACAGTCCCTGTGTGGG	
	26	0%	5'-GCACCTGAGTCATGGACAGTCCAGGGAGTGACACCGAGCC	
	23	0%	5'-CATCACAGTCTCTGTAACGCATCCACGCCCTTTGCGGTAG	
	21	0%	5'-CAGGCAGATGGCATCATACAGTCTTTGTTCGGCATACGTGG	
	17	0%	5'-GCGCTGCTATCCAGTGGAAAGTAGCTCTCTTGTTCGGGTCT	
	17	0%	5'-GGGGGGCGCACTTTGCGTGTCAAATAGTGCCCGACTTGTA	
	16	0%	5'-TTGACCTTCCCGCTAACGTGAAGAGTCGGGGACCACCCTA	

Anhang

	1039 985	0,3% 0,3%	5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTATGGCGGGCTCGGAGTCATTT 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAACTC	
6	132601 95181 31294 31157 19529 18151 15694 14272 12214 6165 5719 4298 3931 3696 3543 3388 3295 3097 2932 2595	22% 15% 5% 5% 3% 2% 2% 2% 1% 0,9% 0,7% 0,6% 0,6% 0,5% 0,5% 0,5% 0,5% 0,4% 0,4%	5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGTTTAT 5' -CACGCGACCGGCGCAGGTTCTGAGGGCAGGTCCAGTAATAT 5' -CAGACGCACCTGGCGCAAGGTTCTGAAGATCAGTTACGTG 5' -ACTTGGACCCGATGCCCGTGGCGCAACGGTCCGGTCCCTTC 5' -ATCGCCCCCTGACGCAAGGGTAGAGCTACTCATTCCGGTCG 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAACTC 5' -TCGCCAATGTGACGCTTCCGGCGCAGGAATCACATTCTTC 5' -ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTCCGAGTTACTTT 5' -CCGACGCACCCGGCGCAGGTTCCGAGATCTAGTTAATTA 5' -GAACGCACGGATCGCCGTTTTCAGGGCCGGTGCAGTGTCTAC 5' -GCCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGTGAGCAGGGGG 5' -CATGAACGCTCCGGTTGCAGGATTCATGAAGCGCGTTAA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTC 5' -TTGGAACACCAATCCTGCAACCGGAGCGTTGGTGTACAA 5' -CAGTGGACATTCGCGCCGATCGCAGGCAATGACTATGGAG 5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTATGGCGGGCTCGGAGTCATTT 5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGGTTAT 5' -GTGACGCGGTTCGACGCAGACCTCACTGTGGGCAGTAACGG 5' -TCTTCCCATTCCGAGGCTGCGCCGGCCGCTCCGAGGGT	S1R10#6 S1R10#4 S1R10#10 S1C10 S1R10#2 S1R10#1
7	71546 66712 44149 32853 26719 22781 22476 18116 17966 17715 16861 10108 7759 6656 6308 6098 5537 4751 3944 3788	11% 10% 6% 5% 4% 3% 3% 2% 2% 2% 2% 1% 1% 1% 0,9% 0,9% 0,8% 0,7% 0,6% 0,6%	5' -CACGCGACCGGCGCAGGTTCTGAGGGCAGGTCCAGTAATAT 5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGTTTAT 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAACTC 5' -ACTTGGACCCGATGCCCGTGGCGCAACGGTCCGGTCCCTTC 5' -CAGACGCACCTGGCGCAAGGTTCTGAAGATCAGTTACGTG 5' -ATCGCCCCCTGACGCAAGGGTAGAGCTACTCATTCCGGTCG 5' -TCTTCCCATTCCGAGGCTGCGCCGGCCGCTCCGAGGGT 5' -CCGACGCACCCGGCGCAGGTTCCGAGATCTAGTTAATTA 5' -ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTCCGAGTTACTTT 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTC 5' -TCGCCAATGTGACGCTTCCGGCGCAGGAATCACATTCTTC 5' -GTTTCGATTGCCGGGCGACGCAGCCCTCGAACTCTCAGACG 5' -GCCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGTGAGCAGGGGG 5' -GATCCCCGTGTAACCGCTTTTCGCCGCAGAAATFACACTT 5' -GTGACGCGGTTCGACGCAGACCTCACTGTGGGCAGTAACGG 5' -CATGAACGCTCCGGTTGCAGGATTCATGAAGCGCGTTAA 5' -TTGGAACACCAATCCTGCAACCGGAGCGTTGGTGTACAA 5' -AATAGCCCCCTGACGCAAGGGTTAGAGCAGTAATCATTTGT 5' -GACTCCGGGACATGCCCATGTGCAATGGTGGCCCGGATT	S1R10#4 S1R10#6 S1R10#10 S1R10#1 S1C10 S1R10#2
8	18938 18279 17866 10476 9857 9743 9425 8582 7337 7067 6323 5812 5173 4133 3932 3799 3487 2862 2737 2228	6% 6% 6% 3% 3% 3% 3% 3% 2% 2% 2% 2% 1% 1% 1% 1% 1% 1% 1% 0,8%	5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGTTTAT 5' -TCTTCCCATTCCGAGGCTGCGCCGGCCGCTCCGAGGGT 5' -CACGCGACCGGCGCAGGTTCTGAGGGCAGGTCCAGTAATAT 5' -ACTTGGACCCGATGCCCGTGGCGCAACGGTCCGGTCCCTTC 5' -CAGACGCACCTGGCGCAAGGTTCTGAAGATCAGTTACGTG 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAACTC 5' -CCGACGCACCCGGCGCAGGTTCCGAGATCTAGTTAATTA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTC 5' -ATCGCCCCCTGACGCAAGGGTAGAGCTACTCATTCCGGTCG 5' -GCCAGAACGCACCGATCGCAGGTTTCTGTGAGCAGGGGG 5' -ATCTCCGATTGCCCCACGACGCAGTGGTCCGAGTTACTTT 5' -GATCCCCGTGTAACCGCTTTTCGCCGCAGAAATFACACTT 5' -GTGACGCGGTTCGACGCAGACCTCACTGTGGGCAGTAACGG 5' -GACTCCGGGACATGCCCATGTGCAATGGTGGCCCGGATT 5' -GGCCTAGAGATTGCCGGTTCGACGCAGACCTCTCTTGATG 5' -GTTTCGATTGCCGGGCGACGCAGCCCTCGAACTCTCAGACG 5' -TGATCGTCCGGACGCGTGTGGCGCAACACTCCGAGACGAA 5' -CATGAACGCTCCGGTTGCAGGATTCATGAAGCGCGTTAA 5' -TTGGAACACCAATCCTGCAACCGGAGCGTTGGTGTACAA	S1R10#6 S1R10#1 S1R10#4 S1R10#10 S1R10#2 S1C10
9	44876 39153 30960 21698 18248 18124	8% 7% 6% 4% 3% 3%	5' -TCTTCCCATTCCGAGGCTGCGCCGGCCGCTCCGAGGGT 5' -CACGCGACCGGCGCAGGTTCTGAGGGCAGGTCCAGTAATAT 5' -ACGCGCCGATCGCAGGCTAGAGCTAATGGCTCAGGTTTAT 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTA 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAACTC 5' -GATTGCCCCCTCGACGCAGAGGTTCTGAGTTGGTACAAATTC	S1R10#1 S1R10#4 S1R10#6 S1R10#2

		13	5' -GGCACGCGCATGACACCGTACCTGCTCT	S3PrIR3#7
		13	5' -ATTCCCATGCCCGTGTGCGCAATGGTGGGAAC	

Tab. A10: Freie Enthalpien (ΔG) aller selektierten und analysierten Streptavidin-Aptamere mit und ohne Primersequenz nach dem Zuker-Algorithmus (mfold)

Aptamer	ΔG ohne Primersequenz	ΔG mit Primersequenz
S1C8a	-4,48	-11,67
S1C9s	-3,81	-12,56
S1C10	-8,62	-9,87
S1C18	-10,29	-11,88
S1R10#1	-10,19	-12,74
S1R10#1a	-10,40	-13,04
S1R10#2	-4,88	-10,88
S1R10#4	-5,98	-13,93
S1R10#6	-8,66	-10,50
S1R10#10	-13,57	-15,30
S2R3#1	-1,56	-8,81
S2R3#2	-1,21	-4,97
S3PrIR3#1	-2,91	-9,51
S3PrIR3#3	-3,79	-7,80
S3PrIR3#5	-6,35	-10,66
S3PrIR3#7	-1,49	-6,81
S3T7IR3#1	-6,60	-10,89
S3T7IR3#3	-7,47	-15,41
S3T7IR3#5	-3,81	-15,34

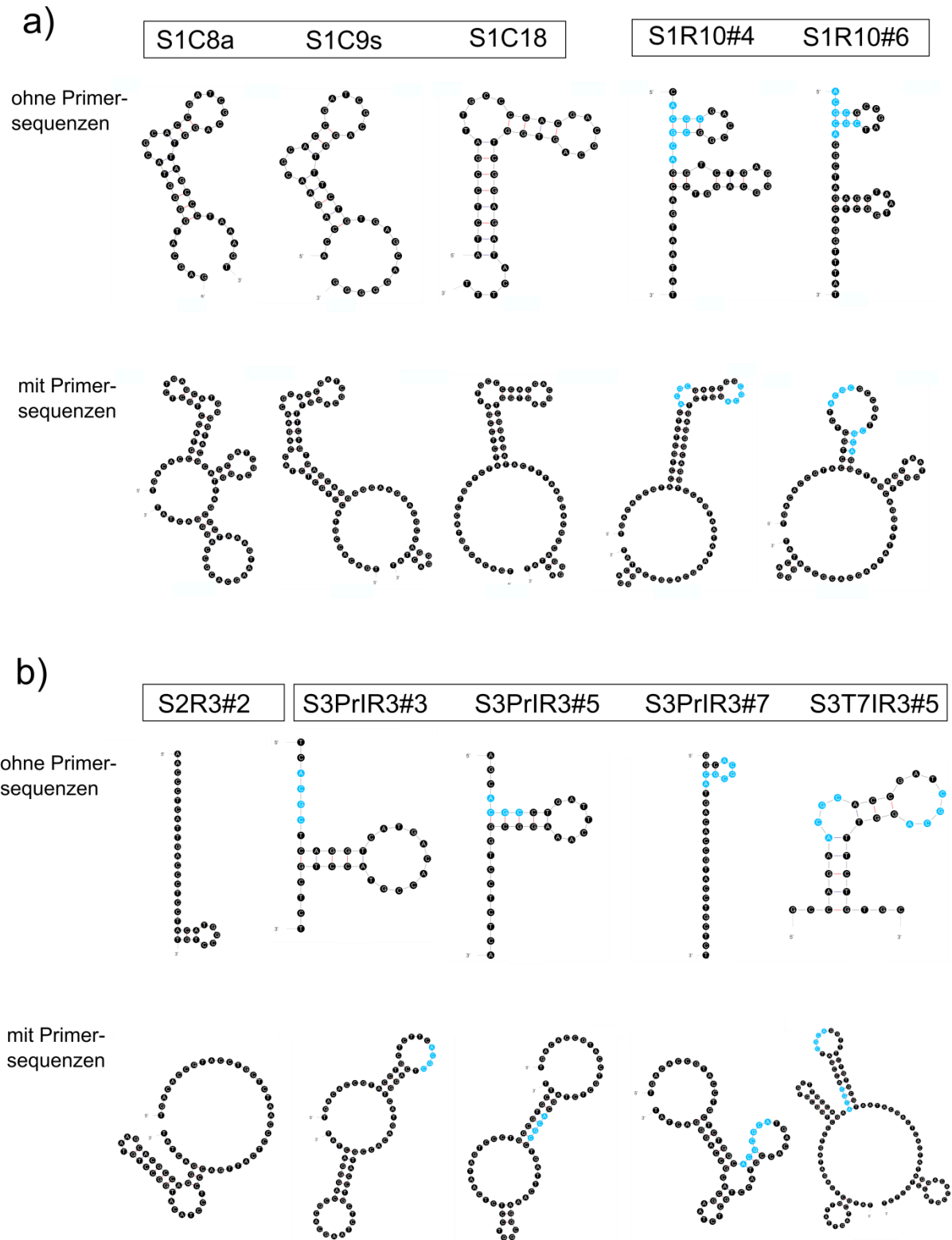


Abb. A1: Sekundärstrukturvorhersagen von Streptavidin-Aptameren aus a) der ersten SELEX mit 10 Runden (S1) und b) der zweiten und dritten Selektion in je 3 Runden (S2 und S3) nach dem Zuker-Algorithmus (mfold)

Tab A11: Top 20 der dritten Runde der „Small molecules“-RNA-SELEX, Sequenzierung mittels Solexa

Runde, Zielmolekül	Häufigkeit	Sequenz
3, Serotonin	17	5' -GTAGTCTTAATTACCTTCGATCACCGGTCGTGGTGGTCAT
	14	5' -CCGATCATGTGCGAGCTGTTTACGGTGTGGTTACCGTAACT
	14	5' -GATAGAGCCCTTGCTTTGTCGAGCAAATATCGACATGGTA
	14	5' -GTTGGCTCAACCGATCCGAATCAGGCGATCCCGATCTGAA
	14	5' -GTTGGTCGGCACGCCTCTCGGACAGGAATCCGAGGGACGC
	13	5' -AAGCCCTTGCCCGCAGCCGTGGGAGGTACTTGTATCTTAC
	12	5' -TGGACACTCCACTTGCAGATCCGACGAATACGGTATCCTG
	10	5' -ACACTCTAGTCTTACTAGCACTCGGTTCGTGCTAGCGTTTCG
	10	5' -CGTGAACCTTTCGGATGTGGACCGAGCCCGATTTGCGAGC
	10	5' -GCCCATAGGTCTTCGGTGGGTACCGTGTAGTGTACTA
	10	5' -GCGTGCATTCTTGAATGCCCTTGTGGTACTGAAGTACTA
	9	5' -CTCTTGACTTTGATGACAGTGACGAGTTACTCACTGTCCG
	9	5' -GACGGGCCGACTCGCTCATCCCAATGGATGAATCCATGAT
	9	5' -GCGGTCCAATTCGTTGGGTACCTAGGCTCGAGTAGCCGA
	8	5' -CGTGAATTACTGTCTGATTTTCAGCTTTGGTGACAACCTTT
	8	5' -CTACTCGGAGCAAATATCCTTTCGCTATGCTTTCGCATGA
	8	5' -CTCGTTTCCGAACCGCTACTTCCCTCAGGAAGAAGACTATC
	8	5' -GTTGTAAAACCGGGGTCAGCGTTACTGATTAACACCTCAT
	7	5' -CATTCGTGCTCACGGTTGTGACGGCGCAGCTCGTTCTGCC
	7	5' -GTTGTGACGAAACACGTAGTGGCAATATTCTTATGCTACT
3, Norepinephrin	180	5' -GTTGTGGACCTGAAGTAGAGCATGTTTCGCTCGTCTTCGG
	109	5' -GAGAGGCGTGACTTCTCCTAGACGGACATGCGTTTCGTTT
	106	5' -GCAGGATTCGTTCTGCACCTTTAATCGGTTCGTATGACCTA
	88	5' -GCGGAGCTTTTACGTCTTCGTGTTTGTTCGACGTTAAT
	81	5' -TACGTGCTCATCACGACTCGGCGATCATATTCACCATAT
	56	5' -GCTCAACTGGCCTACGGAGGACCGTTGATAACTTTCTCA
	54	5' -CTGTGCCGTTTCGTCACAGTTTAGACACAAGGTGTCCACA
	52	5' -GGATGGGTATCCCTTTCGCGGAGAGGTAAAACCTCGCCAG
	52	5' -TAGCCTCCTCACATTTGTGTGGGAAGGTGAAAAATAACCAT
	51	5' -CTCGATCATTCAACTGAACGGGCTTTGCGCTAAAGCTCCT
	48	5' -ACTAGCCTAGGTTAGCCTTTCGCTACCCGAGGACGGGTGA
	48	5' -CGCGATCATTGCGTTTTTACCACAACTGTGCAATATTCAT
	48	5' -GAGGTAGATTTAGAGGCCCTCTGAGCTACTAGTGTAGCAC
	40	5' -ATAGGACGAAGTTGCTCGCCGACCTTGGCCTTAATGGCG
	40	5' -GGCTCTGTTTCATCCCTCATCCCTGTGTCTATTGACACCA
	38	5' -ACTGAGACGCCCTTTCGGTTGTGAGCCGACCACTTTTGTG
	38	5' -GCAGCCTCGGTGCCATAGATAGTCACTTTTGATCTATCAA
	37	5' -GAGACGGTTACGCGTCCTTGGTCTCTACGATAGAGCTAG
	35	5' -CGCTGCCGAAGCGCCGAGGCAGGGATTGTTAGCCTGCACA
	34	5' -GCGACCAATTATGCACCCCCCGTGGTTCAGGTATGTAAC
3, Histamin	5	5' -CACGGGAACCTATGGTCTATCGCGTCTAAGTTTTTCTCT
	5	5' -GACGCGGGTTGCTTAGATAGTGTCTTAGGGCTGCTATCA
	5	5' -GCGATCGGGCACCTCGATCATTGTAGGATGTCATGGCAAT
	5	5' -GCGTCAATTAGGATCATTGTGAAGGCAGTAGGTCACTTCT
	4	5' -AACAACTCTAGCTTTGGCAGCTCGTACCGGGAGTGTAA
	4	5' -AACACTTGTCTGACGATTTTCGACTTAGACATGCAACT
	4	5' -AACGGAGAGTTTCGACACCCCATGCACTGCTCTCTGAGCC
	4	5' -AACGTAAAGAACAATAGGAGGATGGCGTCATTTATAAGC
	4	5' -AACGTAGTCGTCTCTACGCCGAAGGGAGGGCATGTCGTT
	4	5' -ACAAGAGCCATCGTCAATAAGTAGCGGAGGGAGTACGCCA
	4	5' -ACACAAACGTGACAAGAGCTCTTTTGTAACTCTGGTGCT
	4	5' -ACACTAATAGCTATGCTCTTCTCATTATTCGGTAACCCG
	4	5' -ACCCAGCATTAGCCTCCGGCCCCACTTAGTTCGTCTGAAAA
	4	5' -ACGATGCTGGCGTCCGTTCCGGACACTAGAAGATCTCTGG
	4	5' -ACGCCTCGTTTCCCTCGAAATCCGGCTTTGTTGTTTTGT
	4	5' -ACGGCATAACTCACGTTGGCTCTAGTAATGCAACCAACCT
	4	5' -ACGGGATCGCATGTTGCGAAGTTGCATCACGACTTGCCAT
	4	5' -ACGGGCATCGGGGAGGTTTCGTGAGTTCGTGAGATGCATGA
	4	5' -ACGGGCGACAGCTCCTAGTGGTGTGTACTTCCCGGCT
	4	5' -ACGTGGAGGATGTTTGTGCGGTCCTTTTATCTGATCCAGG
3, Dopamin	8	5' -CCAGCAGTATAAGTCGATGACCAACTTCCTAGGGCCAAGC
	8	5' -GCCCAGGACTTCCCACTCGATTCTTGTGTCCCGAATTCTA
	7	5' -ACTACCAGATAGTAGCACTACGTGGATTGATAGTGTGTAG
	7	5' -CACGAAGGTAGGAACATTAGACCATGACTTTGAGTCCTC

	7	5'-CACTATGTTTGTTCAGGCATGTTGATATGCCGCTTGCTTA
	3	5'-CCGACTACAATGGTCCACATGACTTTTGACTATAACCGCAC
	3	5'-CTCGATCGTGTGTAAAGATTCCAGAAGTTTGGGGAATAC
	3	5'-GACCACAGGGCCGCGACAACGTTAAGGGCTGAGCTACATT
	3	5'-GGAGTCACTAACCAGGGTATGCAGCTAATGTAAGGGCTAT
	3	5'-GGTAGGGTGATAATCAACGGGCTGTTGTACGACGGCATAA
	3	5'-GTACATACTGGGTTCAAAAATAGCTTATTGATGTTGAAGT
	3	5'-TACTTACTGGTGAATGATATAATGGTAAGCTGCCATGCCA
	3	5'-TAGCCATCTGTCGTTGGTCTTAGTACCTCCAAGCCTCCCC
	3	5'-TAGGCAGAGTAGCAGGGTAGCCGCATGACTTATTCTAATA
	3	5'-TGGCCATGTATAGCCTCTGAACCTGCTCCACGCAGTTAT
	3	5'-AAAAGGTGACAGATTTATCGGTAGGCATAAGCACCCGGG
	3	5'-AACTGCAACATGATATTAGCGTGAACATTCGTTGTGCGGA
	3	5'-AAGAGCTTGGTACGTGGTCTAGACACCATTTTTTCTCTTT
	3	5'-ACCAAGATCAGAGGATATTCCTGCTGACCGCTGCTAGAA
	3	5'-ACCCAAGCCTGTTAGTATGCTTGGACATGGACCGCAGGC

Tab. A12: Die häufigsten Sequenzen im Pool nach der dritten Selektionsrunde (blau, F=forward), auch in komplementärer Orientierung (R=reverse), die als DNA-Templat für die in vitro-Transkription bestellt wurden, mit Primersequenz und T7-Promotor (schwarz), identifiziert nach der Hochdurchsatzsequenzierung

Ziel-molekül	Klon	Sequenz
Dopamin	Dop1F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG CCAGCAGTATAAGTCGATG ACCAACTTCCTAGGGCCAAGCC
	Dop1R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGGG CTTGGCCCTA GAAGTTGGTCATCGACTTATA
	Dop2F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GCCCAGGACTTCCCCTCG ATTCTTGTGTCCCGAATTCTAC
	Dop2R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG TAGAATTCGGG ACACAAGAATCGAGTGGGAAGT
Serotonin	Ser1F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GTAGTCTTAATTACCTTCG ATCACCGGTCGTGGTGGTCATC
	Ser1R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG ATGACCACCAC GACCGGTGATCGAAGGTAATTA
	Ser2F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG CCGATCATGTCGAGCTGTT TACGGTGTGGTTACCGTAATC
	Ser2R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG AGTTACGGTAA CCACACCGTAAACAGCTCGACA
Histamin	His1F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG CACGGGAACCTATGGTCTA TCGCGTTCTAAGTTTTCTCTC
	His1R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG GAGAGAAAACT TAGAACGCGATAGACCATAGGT
	His2F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GACGCGGGTTGCTTAGATA GTGTCCCTTAGGCGTGCTATCAC
	His2R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG TGATAGCACGC CTAAGGACACTATCTAAGCAAC
Norepi-nephrin	Nor1F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GTGTGGACCTGAAGTAGA GCATGTTTCGCTCGTCTTCGGCC
	Nor1R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG CCGAAGACGAG CGAACATGCTCTACTTCAGGT
	Nor2F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GAGAGGCGTGACTTCTCCT AGACGGACATGCGTTCGTTTTCC
	Nor2R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG AAACGAACGCA TGTCCGTCTAGGAGAAGTCAC
	Nor3F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCAACCGGAAG GCAGGATTCGTTCTGCACC TTTAATCGGTCGTATGACCTAC
	Nor3R	5'-GGGCTAACAGTGC GGTAACACGCACTGGAGGTCCGAAACCGG TAGGTCATACG ACCGATTAAAGGTGCAGAACGA

Publikationen

Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., Erdmann, VA., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M., Arndt, PF. Glökler, J. Accelerating SELEX with next-generation sequencing. *PLoS One* 2011, Vol. 6 (12), e29604

Wiesener, N., **Schütze, T.**, Lapp, S., Lehmann, M., Jarasch-Althof, N., Wutzler, P., Henke, A. Analysis of different DNA vaccines for protection of experimental influenza A virus infection. *Viral Immunology* 2011; Vol. 24, Number 4, 321-330

Schütze, T. & Glökler, J. Tips and tricks of the trade: Idiot-proof emulsion PCR. *LabTimes* 2011; Vol. 5, 1, 50

Schütze, T., Rubelt, F., Repkow, J., Greiner, N., Erdmann, VA., Lehrach, H., Konthur, Z., Glökler, J. A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification. *Analytical Biochemistry* 2011; Vol. 410, 1, 155-157

Lim, TS., **Schütze, T.**, Lehrach, H., Glökler, J., Konthur, Z. Diversity Visualization by Endonuclease - A rapid assay to monitor diverse nucleotide libraries. *Analytical Biochemistry* 2011; 411, 16-21
Gelistet in "Faculty of 1000 Biology"

Glökler, J., **Schütze, T.**, Konthur, Z. Automation in the High-throughput Selection of Random Combinatorial Libraries — Different Approaches for Select Applications. *Molecules* 2010; 15, 2478-2490

Schütze, T., Erdmann, V.A., Glökler, J. Kalibrierte Diversitätsbestimmung von Nukleinsäurebanken. *Laborwelt* 2010; Vol. 11, 1, 15-16.

Schütze, T., Arndt, PF., Menger, M., Wochner, A., Vingron, M., Erdmann, VA., Lehrach, H., Kaps, C., Glökler, J. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO — a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 2009; Vol. 38, e23

Poster

Schütze, T., Braun, H., Vowinkel, J., Greiner, N., Keil, B., Peter, F., Blank, K., Bardua, M., Erdmann, VA., Mörl, M., Vingron, M., Lehrach, H., Arndt, PF., Walther, D., Glökler, J. Qbetter SELEX: putting the Spiegelman monsters behind bars (2011), Mosbach Kolloquium, Mosbach, Germany

Schütze, T., Wochner, A., Menger, M., Erdmann, VA., Glökler, J. DANA — a simple Diversity Assay for Nucleic Acids (2008), RNA 2008 Thirteenth Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Germany

Patentanmeldung

"SELEX based on isothermal amplification",
EP-Anmeldungen: DE102009007929.7 und DE102009036965.1

Vielen Dank!!

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. H. Lehrach und Frau Prof. P. Knaus für die Übernahme der Gutachten bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. V.A. Erdmann und meinem Mentor Herrn Dr. J. Glökler, die es mir ermöglichten diese Arbeit zu schreiben.

Ein „Danke“ auch an Dr. Peter Arndt und Barbara Wilhelm für die Hilfe bei der Bioinformatik, sowie Dr. Zoltan Konthur, Dr. Marcus Menger und Dr. Franziska Peter für die Unterstützung am Biacore sowie Rat & Tat.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Jörn Glökler für die Bereitstellung des Themas und seine freundliche und respektvolle Begleitung, seine Geduld und Hilfe in fachlicher und persönlicher Hinsicht bedanken. Sein freundliches und besonnenes Entgegenkommen sowie die hervorragende Betreuung haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich meiner Arbeitsgruppe für die außergewöhnliche Atmosphäre: Nicole, Hannsjörg und Julia, ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen!

Mein Mann Clemens leistete nicht nur tolle „Familienarbeit“, er hat mich auch in allen Lebenslagen mit seiner Liebe unterstützt: Herzlichen Dank dafür!!

Bei meiner Familie kann ich mich nicht genug bedanken – für ihre Liebe, ihren Humor und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Versicherung

Ich versichere hiermit, dass ich, Tatjana Schütze die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Prüfungsarbeit eingereicht worden.

Berlin, den 18. November 2011