

# Adaption und Automatisierung eines In-vitro-Selektionsverfahrens

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation

von

Martin Bernhard Witt, M. Sc.

2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas  
Tag der Promotion: 03.07.2019

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Thomas Scheper für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses spannenden Themas.

Ein großes Dankeschön auch an Prof. Ursula Rinas für die Übernahme des Koreferats.

Bei Dr. Frank Stahl bedanke ich mich für die gute Betreuung und für die Freiheit, eigene Ideen verfolgen zu dürfen.

Dr. Johanna Walter danke ich sehr für ihren Optimismus und die Bestrebung stets das Positive zu sehen.

Professor Dr. Nils von Neuhoff danke ich für die Bereitstellung des ATP7B-Plasmids.

Danke auch an Martin Pähler, der mir gezeigt hat, wie der Hase im Labor läuft.

Meinen Kollegen danke ich für die gute Zeit – nicht nur – im Institut.

## Abstract

Many modern biotechnological and analytical applications rely on molecular recognition. This field is dominated by antibodies. However, artificial affinity ligands, such as aptamers, are constantly pushing into these applications. Aptamers are selected from a large starting library, composed of highly diverse single stranded DNA or RNA sequences. This selection process is termed SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment).

In this thesis the selection of aptamers will be explored. For this purpose a „minimal“ SELEX was designed, which only covers the core processes of the selection. The minimal SELEX is divided into selection rounds, each spanning the separation of unbound aptamer candidates after the incubation with the target molecules, the amplification of retained aptamer candidates and the production of a new single stranded enriched library. Due to the applied selection pressure, low affinity aptamer candidates are discarded from the enriched library over the course of iterating selection rounds.

To evaluate and control the selection process and to apply a defined selection pressure Real Time PCR based analytics were developed and applied. Implementing a tight monitoring of the selection will indicate possible correcting options and therefore increase the chances of success for the selection of functional aptamers. The functionality of the designed analytics for the minimal SELEX was successfully demonstrated in a selection against His-tag proteins.

Subsequently, minimal SELEX was applied for the selection of aptamers against the Wilson disease protein (ATP7B). However, the selection failed due to the formation of by-products during the amplification of aptamer candidates. These by-products are formed during the annealing phase of the PCR by partial hybridization of aptamer candidates. It could be shown, that the introduction of emulsion PCR effectively suppressed the formation of by-products.

**Keywords:** Aptamer, SELEX, Real Time PCR, Emulsion PCR

## Kurzfassung

Molekulare Erkennung wird in vielen Bereichen der Analytik und Biotechnologie genutzt. Meist werden dabei Antikörper eingesetzt. Aber auch artifizielle Affinitätsliganden wie Aptamere drängen immer stärker in den von Antikörpern dominierten Markt. Aptamere werden im Labor aus einer großen Startbibliothek aus unterschiedlichen, einzelsträngigen RNA- oder DNA-Sequenzen isoliert, dieser Selektionsprozess wird SELEX genannt (kurz für *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*).

In dieser Arbeit soll die Selektion von Aptameren untersucht werden. Dazu wurde eine „minimale“ SELEX entworfen, die dabei den kompletten Kernprozess der Selektion abbildet. So läuft die minimale SELEX in Selektionsrunden aus Abtrennung der ungebundenen Aptamerkandidaten nach Inkubation mit dem Zielmolekül, Amplifikation der verbliebenen Aptamerkandidaten und Produktion neuer einzelsträngiger Aptamerkandidaten. Über mehrere Selektionsrunden werden dabei nieder-affine Aptamerkandidaten aufgrund des angelegten Selektionsdrucks aus der Selektion verdrängt. Um den Prozess beurteilen, kontrollieren sowie einen definierten Selektionsdruck einstellen zu können, wurde eine Analytik auf Basis der Real Time PCR entwickelt. Durch die engmaschige Prozessüberwachung und resultierende Steuerungsmöglichkeiten wird eine Verbesserung der Erfolgsaussichten der Selektion angestrebt. Anschließend wurde die Funktionalität dieser entwickelten minimalen SELEX und der Analytik in einer *de novo* Selektion gegen His-Tag-Proteine demonstriert.

Durch Einsatz dieser Prozessüberwachung konnte gezeigt werden, dass die minimale SELEX beim Einsatz gegen das Wilson-Protein (ATP7B) durch die Bildung von Nebenprodukten während der Amplifikation der Aptamerkandidaten behindert wird. Diese Nebenprodukte entstehen durch partielle Hybridisierung zwischen den Aptamerkandidaten. Durch die Integration der EmulsionsPCR in die SELEX konnte die Entstehung von Nebenprodukten jedoch effektiv unterdrückt werden.

**Schlagwörter:** Aptamer, SELEX, Real Time PCR, EmulsionsPCR

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen der Aptamerselektion</b>	<b>3</b>
2.1	SELEX als Methode zur Selektion von Aptameren	4
2.1.1	Design von Startbibliotheken	6
2.1.2	Zielmoleküle von Aptameren	9
2.1.3	Trennverfahren im SELEX-Prozess	11
2.1.4	Isolierung einzelsträngiger Aptamerkandidaten	15
2.2	Molekulare Mechanismen im SELEX-Prozess	17
2.2.1	Selektionsdruck	17
2.2.2	Theorie zur Amplifikation von Aptamerkandidaten	20
2.3	Analytik für SELEX-Prozesse	24
2.3.1	Überwachung der Oligonukleotid-Stoffmengen	25
2.3.2	Bestimmung der Sequenzdiversität	26
2.3.3	Bestimmung der mittleren Affinität	27
2.4	Unsicherheit der SELEX und fehlgeschlagene Selektionen	28
<b>3</b>	<b>Experimente zur Selektion von Aptameren</b>	<b>30</b>
3.1	Erstellung eines Modell-SELEX-Prozesses	31
3.1.1	Herstellung der Ausgangsmaterialien	31
3.1.2	Analytik von Aptamerkandidaten	39
3.1.3	Aufstellen eines minimalen SELEX-Prozesses	54
3.1.4	Automatisierung des SELEX-Prozesses	68
3.1.5	<i>Proof of principle</i> für den minimalen SELEX-Prozess	70

3.2	Selektion von Aptameren gegen das ATP7B-Protein . . . . .	74
3.2.1	Herstellung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne . . . . .	75
3.2.2	Überlegungen zur Komposition des Selektionspuffers . . . . .	80
3.2.3	Anwendung der minimalen SELEX und deren Begrenzung . . . . .	81
3.2.4	Optimierung durch Einsatz der EmulsionsPCR . . . . .	83
3.2.5	Anpassung der Analytik zur Überwachung der SELEX . . . . .	89
3.3	Optimierter SELEX-Prozess . . . . .	91
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick. . . . .</b>	<b>94</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis . . . . .</b>	<b>99</b>
	<b>Literaturverzeichnis. . . . .</b>	<b>100</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis. . . . .</b>	<b>112</b>
	<b>Tabellenverzeichnis . . . . .</b>	<b>114</b>
<b>A</b>	<b>Zusätzliche Informationen . . . . .</b>	<b>115</b>
A.1	Entstehung von Nebenprodukten bei Verwendung verschiedener Polymerasen . . . . .	115
A.2	Zusätzliche Informationen zum ATP7B-Protein . . . . .	116
<b>B</b>	<b>Methoden. . . . .</b>	<b>119</b>
B.1	Gelelektrophoresen und korrespondierende Färbemethoden . . . . .	119
B.2	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	122
B.3	Real Time PCR . . . . .	122
B.4	Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen .	124
B.5	Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne	128
B.6	Minimale SELEX . . . . .	130
B.7	Optimierte SELEX . . . . .	134

<b>C</b>	<b>Material</b>	<b>139</b>
C.1	Chemikalienliste	139
C.2	Kits und Reagenzien	142
C.3	Oligonukleotide	143
C.4	Verbrauchsmittel	145
C.5	Geräteliste	145
C.6	Software	147
C.7	Bakterien und Plasmide	147

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Für viele analytische Verfahren werden Fänger-moleküle benötigt, die an ihr Ziel-molekül (das so genannte Target) binden können. Diese Fänger-moleküle müssen zahlreiche Anforderungen erfüllen, die eng an ihre Verwendung geknüpft sind. Unabdingbar ist, dass die Fänger-moleküle ihre Targets spezifisch erkennen und von ähnlichen Molekülen unterscheiden können. Wünschenswert sind zudem eine einfache Herstellung und eine längerfristige Lagerfähigkeit, auch ohne Kühlung. Insbesondere diese Anforderungen werden von Antikörpern teilweise nur schlecht erfüllt, daher werden Alternativen für die Forschung und Diagnostik benötigt. Eine vielversprechende Alternative sind Aptamere, einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die gegenüber ihrem Zielmolekül eine hohe Affinität aufweisen und ähnliche Bindungseigenschaften besitzen wie Antikörper. Die bindenden Sequenzen werden im Labor nach ihren Bindungseigenschaften zu ihrem Target in einem iterativen Prozess progressiv aus einer Oligonukleotid-Bibliothek angereichert. Dieser Prozess wird SELEX genannt (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*). Die SELEX läuft dabei komplett in Reaktionsgefäßen ab (*in vitro*).

Zunächst werden aus einer hoch komplexen, kombinatorischen Oligonukleotid-Bibliothek (etwa  $10^{15}$  unterschiedliche Sequenzen) die bindenden Sequenzen gegen das ausgewählte Zielmolekül isoliert. Anschließend erfolgt die Vermehrung der bindenden Oligonukleotide in einer PCR. Die so entstandene Teil-Bibliothek wird erneut mit dem Target inkubiert. Dabei werden die Konzentrationsverhältnisse so eingestellt, dass die bindenden Oligonukleotide im Überschuss zu den freien Bindestellen am Target vorliegen. Durch die entstehende Konkurrenz um die Bindungsstellen am Target wird ein Selektionsdruck erzeugt, so dass die Oligonukleotide mit niedriger Affinität aus der Teil-Bibliothek entfernt werden. Die verbleibenden, besser bindenden Oligonukleotide, werden erneut vermehrt. Durch Wiederholung dieser Abfolge werden nach und nach die besten Binder in der Teil-

Bibliothek angereichert. Am Ende dieses Prozesses erfolgt die Identifizierung der Sequenzen aus der erhaltenen Teil-Bibliothek, sowie die Charakterisierung der einzelnen Aptamere.

Aptamere haben vielfältige Verwendungsmöglichkeiten. So können Aptamere beispielsweise in Produktionsprozessen für die Aufreinigung von Proteinen <sup>(1)</sup> oder die Abreicherung von Toxinen <sup>(2)</sup> verwendet werden. Auch für analytische Anwendungen werden Aptamere in verschiedenen Formaten eingesetzt (z. B. in Microarrays <sup>(3)</sup>, Durchflusszytometrie <sup>(4)</sup>, Lateral Flow Assays <sup>(5)</sup> oder Biosensoren <sup>(6)</sup>). Zudem werden die Möglichkeiten eines gezielten Transports von Wirkstoffen in Aptamer—konjugierten Partikeln für die Krebstherapie erforscht <sup>(7)</sup>.

Obwohl Aptameren als Alternative zu Antikörpern ein großes Potential vorhergesagt wird, bleibt eine breite Nutzung bisher aus. Dies liegt vor allem daran, dass eine Aptamerselektion kostenintensiv ist und gleichzeitig unsichere Erfolgsaussichten aufweist. Aufgrund der Kommerzialisierung der SELEX bleiben wichtige, gewonnene Erkenntnisse bei den jeweiligen Firmen unter Verschluss. Das frei verfügbare Wissen über die SELEX, insbesondere über die Mechanismen innerhalb der SELEX, ist daher begrenzt und führt zu den beschriebenen unsicheren Erfolgsaussichten. Die Selektion von Aptameren soll daher im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Dem Aufbau einer geeigneten Analytik zur Überwachung der SELEX kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Die Integration einer präzisen Analytik in die SELEX ermöglicht zusätzlich zur retrospektiven Untersuchung auch eine proaktive Steuerung der SELEX und somit mehr Kontrolle über den Prozess, dadurch steigen auch die Erfolgsaussichten der Selektion. Weiterhin soll ein *in vitro* Selektionsverfahren etabliert und in seinen Einzelschritten analysiert, optimiert und teilweise auch automatisiert werden. In diesem Zusammenhang soll die Anwendbarkeit der Analytik geprüft werden.

## 2 Theoretische Grundlagen der Aptamere Selektion

Grundlegendes Schema einer Aptamere Selektion ist die wiederholte Affinitätstrennung und Amplifikation von einer Bibliothek aus Nukleinsäuren unterschiedlicher Sequenz in einem zyklischen Prozess, der *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment* (SELEX) genannt wird (vgl. Abb. 2.1.1). Ein SELEX-Prozess ist dabei aus vielen Verfahrensschritten zusammengesetzt, die ursprünglich für andere Anwendungen entwickelt wurden. So stammen die verwendeten Trenntechniken meist aus der Chemie und der Bioprozesstechnik, während die PCR zur Amplifikation der Aptamere aus der Molekularbiologie stammt. Die Besonderheit im SELEX-Prozess ist die Verwendung dieser Verfahren für eine gleichzeitige Testung von bis zu  $10^{15}$  Sequenzen, im Gegensatz zu einem klassischen *Screen*, in dem alle Kandidaten jeweils einzeln getestet werden. Im SELEX-Prozess unterliegen die Sequenzen dabei einem Selektionsdruck, der niederaffine Sequenzen aus der SELEX drängt. Zu Beginn der SELEX liegt die Häufigkeit der späteren Aptamere in der Bibliothek aller Sequenzen bei etwa  $10^{-10}$  bis  $10^{-14}$  <sup>(8)</sup>. Dies verdeutlicht die enorme Leistung bei der Anreicherung affiner Sequenzen, die der SELEX-Prozess durch sein zyklisches Design erreichen kann. Ein SELEX-Prozess dauert dabei mehrere Wochen bis Monate an die sich die Charakterisierung der selektierten Aptamere anschließt.

Seit ihrer ersten Beschreibung wurde die SELEX in vielen Variationen durchgeführt. Die große Komplexität der SELEX als Gesamtprozess und die Vielzahl an Variationen sowie Abweichungen von den jeweils publizierten Protokollen erschweren jedoch die quantitative Beschreibung von beobachteten Effekten. Genaue Analysen erfordern dabei die vollständige Erfassung der jeweiligen angereicherten Bibliothek, dieser Aufwand wird jedoch selten betrieben, sobald einmal ein Aptamer für ein Zielmolekül gefunden wurde. Mathematische und bioinformatische Modelle wurden entwickelt, sind jedoch durch die unzureichende Qualität der verfügbaren Modelle limitiert und sind nur begrenzt verlässliche Werkzeuge für Analysen und Prognosen.

## 2.1 SELEX als Methode zur Selektion von Aptameren

Die Selektion verläuft in mehreren sogenannten Selektionsrunden (vgl. Abb. 2.1.1).

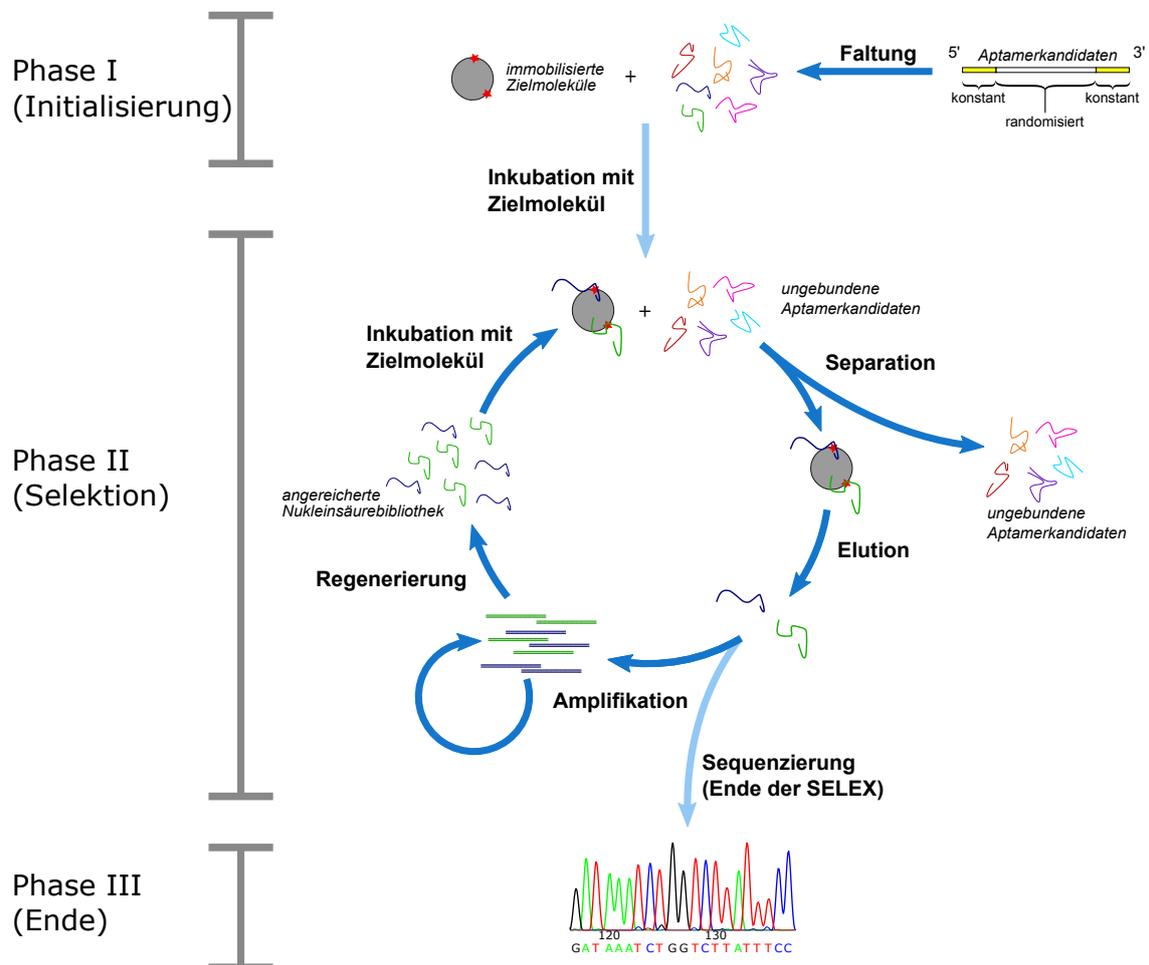


Abb. 2.1.1: Schematische Übersicht über den Ablauf eines SELEX-Prozesses

Zu Beginn des SELEX-Prozesses wird eine große Bibliothek an Aptamerkandidaten eingesetzt, die  $10^{14}$  bis  $10^{15}$  unterschiedliche Aptamerkandidaten enthält. Jeder Aptamerkandidat ist dabei ein einzelsträngiges Oligonukleotid mit einer individuellen zentralen Region, in der die Nukleotide in zufälliger Reihenfolge aufgereiht sind. Flankiert wird diese zentrale Region von zwei konstanten Regionen, die für alle Aptamerkandidaten identisch sind und die im Verlauf der SELEX zur Amplifikation der Aptamerkandidaten mittels PCR genutzt werden. Abhängig von der

## Theoretische Grundlagen der Aptamere Selektion

---

Sequenz ihrer zentralen Region nehmen die Aptamerkandidaten jeweils ihre individuelle dreidimensionale Faltung ein und weisen individuelle Charakteristika für eine Bindung an das Zielmolekül auf.

Im ersten Schritt einer Selektionsrunde werden die Aptamerkandidaten mit ihren Zielmolekülen - auch *Target* genannt - inkubiert. Ein kleiner Teil der Gesamtmenge an Aptamerkandidaten bindet während der Inkubation an das Zielmolekül. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Aptamerkandidaten abgetrennt und aus dem SELEX-Prozess entfernt. Die verbliebenen Aptamerkandidaten werden nun aus ihren Komplexen mit den Zielmolekülen gelöst und in einer PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation müssen die Aptamerkandidaten von ihren entsprechenden Gegensträngen getrennt werden, um Einzelstränge für die nächste Selektionsrunde zu erhalten.

Von den anfangs eingesetzten Aptamerkandidaten scheidet eine große Menge während der ersten Selektionsrunde aus. Die verbliebenen Aptamerkandidaten werden amplifiziert und gehen anschließend in die nächste Selektionsrunde ein. Ab diesem Punkt befinden sich mehrere Klone derselben Aptamerkandidaten in der Bibliothek, die Vielfalt der Aptamerkandidaten ist zurückgegangen. Im SELEX-Prozess werden ab diesem Zeitpunkt stets weniger Zielmoleküle angeboten als Aptamerkandidaten vorhanden sind, dadurch treten die Aptamerkandidaten untereinander in Konkurrenz um die begrenzte Anzahl an Bindestellen. So scheiden auch in den späteren Selektionsrunden Aptamerkandidaten aus, bis lediglich eine kleine Anzahl von unterschiedlichen Aptamerkandidaten in der Bibliothek verbleibt. Die Aptamerkandidaten werden abschließend sequenziert und auf ihre Eigenschaften bezüglich der Bindung des Zielmoleküls analysiert.

## 2.1.1 Design von Startbibliotheken

Zu Beginn der SELEX werden eine große Menge jeweils unterschiedlicher Sequenzen eingesetzt. Innerhalb dieser Bibliothek an Aptamerkandidaten befinden sich die späteren Aptamere sowie eine hohe Anzahl nichtaffiner Sequenzen, die im Verlauf der SELEX abgetrennt werden sollen. Das Design der Bibliothek bestimmt dabei die Art und Vielfältigkeit der Aptamerkandidaten genauso wie die Möglichkeiten für deren spätere Amplifikation im Verlauf der SELEX. Dem Aufbau der Bibliothek kommt also große Bedeutung zu.

Aptamere können prinzipiell entweder als DNA oder RNA selektiert werden. Im Unterschied zur DNA ermöglicht eine Ausführung als RNA den Aptamerkandidaten eine erhöhte strukturelle Vielfalt, die durch die zusätzliche Hydroxylgruppe in der Position 2 der Ribose gegeben wird <sup>(9)</sup>. So können bei bereits selektierten Aptameren DNA- und RNA-Varianten nicht ohne Nachteile gegeneinander ausgetauscht werden. Dabei zeichnen sich Aptamere aus DNA durch eine erhöhte Stabilität gegenüber Degradation aus. Trotzdem sind Selektionen von DNA- und RNA-Aptameren etwa gleich erfolgreich (um 30 %) <sup>(10)</sup>.

### Strukturelle Vielfalt innerhalb der Bibliothek

Die strukturelle Varianz zwischen den Aptamerkandidaten wird durch randomisierte Regionen innerhalb der Sequenz der Aptamerkandidaten geschaffen. Abhängig von ihrer jeweiligen Sequenz falten sich die Aptamerkandidaten entsprechend in ihre Sekundärstruktur und nehmen eine spezifische dreidimensionale Faltung an (vgl. Abb. 2.1.2).

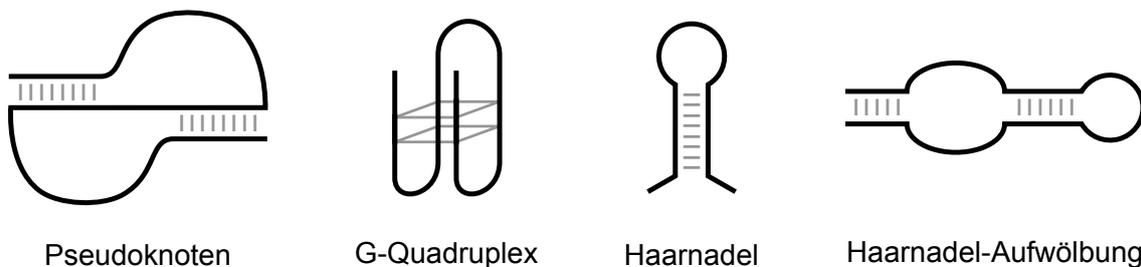


Abb. 2.1.2: Auswahl möglicher Sekundärstrukturmotive von Aptameren <sup>nach (11)</sup>

Für die Generierung verschiedener Bibliotheken wird zwischen vorstrukturierten Varianten und kompletter Randomisierung unterschieden. Vorstrukturierte Varianten sind meist modifizierte Formen bekannter Sequenzmotive, in denen lediglich Teilbereiche randomisiert wurden, beispielsweise freiliegende Schleifen. Diese Startbibliotheken werden oft eingesetzt, um Bindeeigenschaften bekannter Aptamere zu optimieren. Vorstrukturierte Bibliotheken können alternativ auch durch bewusste Erzeugung von Sekundärstrukturen in bioinformatischen Verfahren erzeugt werden <sup>(12)</sup>. Diese Bibliotheken sind dabei nicht von einer bindenden Sequenz abgeleitet, verfügen aber über strukturgebende Bereiche innerhalb der zentralen Region, die von randomisierten Bereichen flankiert werden. Komplette randomisierte Regionen werden dagegen zur *de novo* Selektion von Aptameren eingesetzt. In *de novo* Selektionen scheinen komplett randomisierte Aptamerkandidaten gegenüber vorstrukturierten Bibliotheken erfolgreicher zu sein <sup>(13)</sup>.

Auch die Länge des randomisierten Bereichs hat Einfluss auf die Aptamerkandidaten. So steigt die Häufigkeit eines Sequenzmotives mit zunehmender Länge der randomisierten Region. Gleichzeitig mindert die zunehmende Tendenz der flankierenden Regionen ebenfalls Sekundärstrukturen auszubilden, die Chance auf eine korrekte Faltung des Sequenzmotives <sup>(14)</sup>. So können auch Aptamerkandidaten mit einem affinen Sequenzmotiv in der SELEX nicht erfolgreich sein, falls die korrekte Faltung des Sequenzmotives durch angrenzende Bereiche unterdrückt wird und der Aptamerkandidat eine andere globale Faltung einnimmt (globale vs. lokale Energieminima für die Faltung der Aptamerkandidaten). Trotzdem weisen längere randomisierte Regionen mehr strukturelle Vielfalt auf und sind daher gegenüber kürzeren Aptamerkandidaten zu bevorzugen <sup>(15)</sup>. Wegen der drohenden mangelhaften strukturellen Vielfalt sollte die randomisierte Region in totalrandomisierten Aptamerkandidaten nicht unter 30 Nukleotide lang sein <sup>(16, 17)</sup>. Eine übermäßige Ausdehnung der randomisierten Region führt jedoch zu unerwünschten Effekten. So geht beispielsweise die Synthese langer, einzelsträngiger Fragmente über 80 Nukleotide auch heute noch mit einem großen Anteil kürzerer, unvollständiger Se-

quenzen als Nebenprodukten einher. Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass zu lange randomisierte Regionen in Selektionen weniger erfolgreich sind <sup>(18)</sup>.

### Synthesebias

Die Synthese der randomisierten Region ist einem systematischen Fehler in der Gleichverteilung der Nukleotide unterworfen (Synthesebias). Dieser Bias wurde bei *next generation sequencing* (NGS) Untersuchungen entdeckt und basiert auf einer leichten Varianz der Kupplungseffizienzen zwischen den unterschiedlichen Nukleotiden. So kommt es bei der Synthese von Oligonukleotiden dazu, dass die Verteilung der Nukleotide und, infolge dessen, auch die Verteilung der Sequenzmotive in der Startbibliothek verzerrt wird <sup>(17, 19)</sup>. Durch entsprechende Änderungen der Konzentrationsverhältnisse zwischen den Nukleotiden in der Synthese auf 1,5/1,25/1,15/1,0 (A/C/G/T) kann dieser Synthesebias jedoch ausgeglichen werden <sup>(12)</sup>.

### Primerregionen der Aptamerkandidaten

Die Primerregionen der Aptamerkandidaten können teilweise die native Faltung der randomisierten Region stören <sup>(9, 14)</sup> oder in die minimal bindende Sequenz (*minimal binding motif*) des Aptamers rekrutiert werden <sup>(17, 20)</sup>. Beide Einflüsse sind im SELEX-Prozess unerwünscht, da sie die strukturelle Vielfalt der Aptamerkandidaten mindern. Deshalb wurden spezielle Verfahren entwickelt um die Primerbereiche zu verkürzen oder komplett zu entfernen. So werden in der *minimal Primer SELEX* und in der *primer free SELEX* die Primer mit Restriktionsenzymen entweder teilweise oder vollständig von den Aptamerkandidaten abgespalten <sup>(9, 21)</sup>. Für die Amplifikation müssen die Primerbereiche jedoch durch Ligation wiederhergestellt werden. Als Alternative zur Abspaltung der Primerregionen können die Primerregionen auch durch Hybridisieren eines komplementären Oligonukleotids „inaktiviert“ werden <sup>(22)</sup>.

### Chemisch modifizierte Nukleotide

Aptamere drängen als Affinitätsliganden in die Anwendungsfelder, die traditionell von Antikörpern dominiert sind. Im Vergleich zu Antikörpern werden Aptamere jedoch relativ schnell im Blut abgebaut oder über die Nieren ausgeschieden. Bisher wurde diesen Problemen mit der nachträglichen Modifikation der Aptamere begegnet. Ein wesentlicher Nachteil der Aptamere ist zudem die stark begrenzte Funktionalität von Nukleinsäuren im Vergleich zu Aminosäuren, insbesondere zu hydrophoben Interaktionen sind Nukleinsäuren nur begrenzt fähig <sup>(10, 23–25)</sup>. Daher wird seit einiger Zeit an der Integration modifizierter Nukleotide in die SELEX gearbeitet. Artificielle Nukleotide steigern dabei die Stabilität der Aptamere, deren Möglichkeiten zur dreidimensionalen Faltung und molekularen Erkennung <sup>(17)</sup>. Neben den natürlichen Formen der Aptamere wie RNA und DNA finden zunehmend modifizierte Zucker Eingang in die Selektion (XNA) <sup>(26)</sup>. Diese Entwicklung ist jedoch von der Generierung neuer substrattoleranter Polymerasen abhängig <sup>(23)</sup>. Gleichzeitig wird auch an der Erweiterung der Funktionalität der Nukleobasen gearbeitet. So können beispielsweise chemische Modifikationen am C5 der Pyrimidine eingebracht werden, da diese Position nicht in die Watson/Crick Basenpaarung involviert ist <sup>(23, 25)</sup>. Auch neue Basenpaare mit hydrophobem Charakter, wie das Basenpaar *D* (7-(2-thienyl)imidazo[4,5-b]pyridin) und *Px* (2-nitro-4-propynylpyrrol), wurden bereits in den SELEX-Prozess integriert <sup>(24)</sup>. Dabei verbessert die Integration artifiziieller Basen sowohl die Erfolgchance der SELEX, als auch die Affinität der selektierten Aptamere <sup>(27)</sup>.

### 2.1.2 Zielmoleküle von Aptameren

Aptamere können gegen eine Vielzahl unterschiedliche Ziele gerichtet werden. So wurden unter anderem bereits Aptamere gegen kleine Metallionen, kleine organische Moleküle wie Malachitgrün oder Ethanolamin, Aminosäuren, Nukleotide, enzymatische Kofaktoren, aber auch größere Moleküle wie Peptide und Proteine bis hin zu komplexen Partikeln wie Viren, Sporen von *Bacillus anthracis* oder kompletten Zellen entwickelt <sup>(28)</sup>.

### Grundlagen der Interaktion zwischen Zielmolekülen und Aptameren

Aptamere interagieren mit ihren Zielmolekülen über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen<sup>(29, 30)</sup>. Die Spezifität des Aptamers wird durch strukturelle Komplementarität des Aptamers gegen die Raumforderungen des Zielmoleküls gegeben. Die Faltung des Aptamers ist dabei im hohen Grade von der chemischen Umgebung abhängig<sup>(31)</sup>. Oft vollziehen Aptamere bei der Bindung des Zielmoleküls eine Konformationsänderung (*induced fit* Mechanismus)<sup>(12, 32)</sup>.

### Notwendige Eigenschaften der Zielmoleküle

Die Möglichkeiten des Zielmoleküls über funktionelle Gruppen mit dem Aptamer zu interagieren hat direkten Einfluss auf die Erfolgsaussicht zur Selektion affiner Aptamere. Beispielsweise wirken sich Donoren und Akzeptoren von Wasserstoffbrücken oder aromatische Ringe auf der Oberfläche entsprechend positiv auf das Selektionsergebnis aus<sup>(28)</sup>. Auch die Größe der Oberfläche eines Zielmoleküls als quantitatives Maß für die Möglichkeiten zur Interaktion hat Einfluss auf die spätere Affinität der Aptamere, so weisen Aptamere gegen Proteine meist Dissoziationskonstanten zwischen  $10^{-9}$  M bis  $10^{-11}$  M auf, während diese für kleine Moleküle meist im Bereich von  $10^{-3}$  M bis  $10^{-7}$  M liegen<sup>(18)</sup>.

Zusätzlich hat die Ladung des Zielmoleküls einen direkten Einfluss für die Zugänglichkeit in der Selektion. Als Polyanion bevorzugen Aptamere positiv geladene Regionen auf der Oberfläche des Zielmoleküls, dementsprechend ist die Selektion gegen negativ geladene oder stark hydrophobe Moleküle erschwert<sup>(28)</sup>. Generell lässt sich dieser Zusammenhang auch abhängig vom isoelektrischen Punkt (pI) oder der vom pH-Wert abhängigen Nettoladung des Zielmoleküls beschreiben. Dabei gilt, je positiver die Nettoladung oder je größer der pI des Zielmoleküls, desto stärker ist die Affinität der Aptamere<sup>(33)</sup>. Ein hohes Maß an posttranslationaler Glykosylierung führt bei Proteinen zur Absenkung des pI und erschwert dementsprechend die Selektion<sup>(10)</sup>. Im Verlauf der Selektion können positiv geladene Teilflächen auf der Oberfläche von Zielmolekülen aber auch zur unspezifischen Bin-

dung der Aptamerkandidaten führen. Die Aminosäuren Lysin und Arginin sind bei physiologischen pH-Werten positiv geladen und dienen daher oft als unspezifische Bindestellen für Aptamere an Proteine. Dies ist besonders ein Problem in Selektionen gegen Wachstumsfaktoren, die naturgemäß an polyanionische Nucleinsäuren binden <sup>(16)</sup>.

Neben funktionellen Gruppen für die Interaktion mit den Aptamerkandidaten und einer entsprechenden Verteilung von Ladungen auf der Oberfläche müssen Zielmoleküle für eine erfolgreiche Selektion auch ein Mindestmaß an struktureller Rigidität besitzen. So ist die Affinität der Aptamere, die gegen ein strukturell instabiles Zielmolekül selektiert wurden, meist mangelhaft oder die Selektion scheitert komplett <sup>(10, 34)</sup>. Ebenso wichtig ist in diesem Zusammenhang die kontinuierliche Präsentation korrekt gefalteter Zielmoleküle über den gesamten Verlauf der SELEX <sup>(35)</sup>.

### 2.1.3 Trennverfahren im SELEX-Prozess

Innerhalb der SELEX werden die Aptamerkandidaten wiederholt über ihre Affinität zum Zielmolekül fraktioniert. Den eingesetzten Trennverfahren kommt daher eine Schlüsselrolle zu. Prinzipiell ist hier jedes Verfahren anwendbar, das erfolgreich gebundene von ungebundenen Aptamerkandidaten abtrennen kann. So wurden Selektionen mit sehr einfachen Trennverfahren wie Bindung an Nitrocellulosemembranen oder Affinitätschromatographie genauso beschrieben wie hochtechnisierte Verfahren in Kapillarelektrophoresen oder mikrofluidischen Systemen. Dabei lassen sich alle Trennverfahren entweder in homogene Verfahren oder heterogene Trennverfahren mit stationärer Phase einteilen.

#### **Heterogene Trennverfahren**

In heterogenen Trennverfahren ist die Präsentation der Zielmoleküle von entscheidender Bedeutung. So kann die Immobilisierung der Zielmoleküle zu Änderungen in deren Struktur führen <sup>(36)</sup>. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass Aptamere gegen die eingesetzten Linker oder gegen die Matrix selektiert werden <sup>(12, 13)</sup>.

Auch die Immobilisierungsdichte ist ein wichtiger Faktor. Eine zu geringe Immobilisierungsdichte kann beispielsweise zur Deformation der Zielmoleküle führen und / oder die Bibliothek der Aptamerkandidaten wegen einer zu geringen Anzahl an Zielmolekülen für eine erfolgreiche Selektion zu stark ausdünnen. Andererseits stört eine zu hohe Immobilisierungsdichte die Selektion eventuell durch Ausbildung stark ausgeprägter (negativer) Oberflächenladungen auf der Matrix, die Aptamere elektrostatisch abstoßen. Auch sterische Hinderungen, *molecular crowding* oder die Bindung eines Aptamerkandidaten an mehrere Zielmoleküle können bei hohen Immobilisierungsdichten auftreten <sup>(13)</sup>. Die Immobilisierungsdichte wird als Parameter in vielen Publikationen vernachlässigt oder willkürlich festgelegt. In vielen modernen SELEX-Prozessen werden heterogene Trennverfahren meist auf Basis funktionalisierter Magnetpartikel eingesetzt. Die optionale Integration in mikrofluidische Systeme ermöglicht dabei eine strikte, reproduzierbare Kontrolle der Reaktionsparameter, sowie eine stringente Selektion durch kontinuierliche Waschschriffe <sup>(13, 33, 37-39)</sup>.

### Homogene Trennverfahren

Homogene Trennverfahren haben den Vorteil, dass weder die Aptamerkandidaten, noch das Zielmolekül immobilisiert werden müssen und daher beide Komplexpartner unmodifiziert miteinander interagieren können. Neben klassischen homogenen Trennverfahren wie der Zentrifugation (z. B. bei der Selektion gegen Zellen) oder der Ultrafiltration beruhen die meisten homogenen Trennverfahren auf Unterschieden der elektrophoretischen Mobilität. Entsprechend wird in diesen Selektionen entweder ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) oder eine Kapillarelektrophorese (CE) eingesetzt. Für eine elektrophoretische Trennung der Aptamer-Ziel-Komplexe von ungebundenen Aptamerkandidaten müssen die Zielmoleküle ein anderes Masse/Ladungsverhältnis aufweisen, als die freien Aptamerkandidaten <sup>(13, 40)</sup>. Daher ist die Abtrennung für kleine Moleküle schwierig und nur durch signifikante Einbußen der Selektionseffizienz erreichbar <sup>(12, 41)</sup>. Für geeignete Zielmoleküle ermöglicht die Kapillarelektrophorese jedoch sehr hohe

Selektionseffizienzen von 1 aus  $10^4 - 10^5$  während konventionelle Verfahren lediglich Effizienzen von 1 aus 10 – 100 erreichen <sup>(42)</sup>. Nachteil elektrophoretischer Verfahren ist eine starke Limitierung der eingesetzten Volumina, die sich in einer begrenzten Anzahl an Aptamerkandidaten in der Größenordnung von  $10^{13}$  niederschlägt, während konventionelle Trennverfahren bis zu  $10^{15}$  Aptamerkandidaten gleichzeitig bewältigen können <sup>(43)</sup>. Weitere Nachteile elektrophoretischer Verfahren sind die Restriktionen auf die speziellen Pufferbedingungen, die zur Elektrophorese nötig sind, sowie Schwankungen der Salzkonzentration und Temperatur im Verlauf der Elektrophorese <sup>(17)</sup>.

### **Besonderheiten bei Selektionen gegen kleine Moleküle**

Selektionen gegen kleine Moleküle stellen besondere Herausforderungen dar. Kleine Moleküle weisen eine kleine Oberfläche mit wenigen funktionalen Gruppen zur Interaktion mit Aptamerkandidaten oder für die Immobilisierung auf <sup>(36)</sup>. Deswegen wurden spezielle Selektionsstrategien für kleine Moleküle entwickelt. Entgegen der konventionellen Selektionsverfahren werden in diesen speziellen Verfahren die Aptamerkandidaten reversibel immobilisiert, während die kleinen Moleküle unmodifiziert eingesetzt werden. Diese Immobilisierung der Aptamerkandidaten erfolgt entweder über komplementäre Oligonukleotide <sup>(29, 44, 45)</sup> oder unspezifisch an Graphen-Oxid über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung <sup>(12, 46)</sup>. Die so immobilisierten Aptamerkandidaten werden dann mit den Zielmolekülen inkubiert. Bei der Bindung des Targets an das Aptamer kommt es zur Konformationsänderung des Aptamers und zur Ablösung des Aptamer-Target-Komplexes von der stationären Phase, nicht affine Aptamere verbleiben immobilisiert und werden aus der SELEX entfernt. Voraussetzung für diese Trennverfahren ist die Konformationsänderung, die zur Desorption von der Matrix notwendig ist. Gleichzeitig müssen die Kräfte für die Desorption von der Matrix die Stärke der Bindung an die Matrix übersteigen <sup>(29)</sup>. Trotz dieser Einschränkungen stellen die präsentierten Trennverfahren signifikante Verbesserungen für die Selektion gegen kleine Moleküle dar, da diese nicht mehr immobilisiert werden müssen.

### Besonderheiten bei Selektionen gegen Zellen

Selektionen gegen Zellen weisen einige Vorteile gegenüber konventionellen Selektionen gegen einzelne isolierte Ziele auf. So ist kein Vorwissen über das Zielmolekül und keine Präparation des Zielmoleküls nötig<sup>(47)</sup>. Gleichzeitig kann sich die Selektion gegen verschiedene Zielmoleküle der Zelle richten, entsprechende Probleme der Interaktion einzelner Ziele mit den Aptamerkandidaten werden so ausgeglichen. Dafür richten sich die Selektionen meist gegen die häufigsten Zielmoleküle, die jedoch nicht notwendigerweise spezifisch für diese Zellen sind<sup>(43)</sup>. Ein Vorteil der Selektion gegen lebende Zellen ist die native Faltung und posttranslationale Modifikation der Zielmoleküle, sodass die Aptamere später ebenfalls in der Lage sind die nativen Formen der Zielmoleküle zu erkennen<sup>(47)</sup>. In jeder Zellpopulation befinden sich jedoch auch tote Zellen, die zur Selektion ungewünschter Aptamere führen können<sup>(48)</sup>. Trennverfahren der Wahl ist für Selektionen gegen Zellen meist *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Nachteil dieses Trennverfahrens ist die Limitierung auf  $10^8$  sortierte Zellen<sup>(13)</sup>.

### Selektionsverfahren für spezielle Eigenschaften

Selektionsprozesse können auch auf andere Funktionen, als auf die Affinität gegen ein Zielmolekül gerichtet werden. Für die Entwicklung spezifischer quantitativer Tests ist beispielsweise ein Sandwich mit zwei Affinitätsliganden vorteilhaft. So kann der SELEX-Prozess durch maskieren der primären Bindestelle auch gegen weniger vorteilhafte Bindestellen gelenkt werden<sup>(27)</sup>. Alternativ werden in den Selektionen jeweils unterschiedliche Domänen desselben Ziels angeboten. Zusätzlich kann die Affinität durch Multivalenz erhöht werden. Dazu werden in einer Selektion zwei bereits bekannte Aptamere gegen ein Zielmolekül mit einer randomisierten Zwischensequenz verbunden, deren Eigenschaften anschließend in einer SELEX optimiert werden<sup>(49)</sup>. Daneben können Sequenzen auch mit anderen Eigenschaften wie beispielsweise einer katalytischen Aktivität (z. B. DNAzyme)<sup>(50)</sup> oder als *self reporting* Systeme mit Rekrutierung von fluoreszenten Farbstoffen selektiert werden<sup>(51)</sup>.

### 2.1.4 Isolierung einzelsträngiger Aptamerkandidaten

Nach einem Selektionsschritt werden die Aptamerkandidaten in einer PCR vervielfältigt. Die Aptamerkandidaten liegen dann im Komplex mit ihren komplementären Strängen vor. Damit die Aptamerkandidaten ihre korrekte Faltung einnehmen können müssen diese jedoch einzelsträngig vorliegen.

Eine Möglichkeit zur direkten Erzeugung einzelsträngiger Aptamerkandidaten ist die asymmetrische PCR. In der asymmetrischen PCR wird die Konzentration eines Primers limitiert, während der andere Primer im Überschuss vorliegt. Dadurch kommt es zunächst zu einer Vervielfältigung des Eingangsmaterials wie in einer normalen PCR, bis der limitierende Primer verbraucht ist. Ab diesem Punkt dienen die erzeugten Doppelstränge lediglich als Matrize zur Erzeugung von Einzelsträngen mit den verbliebenen Primern (vgl. Abb. 2.1.3).

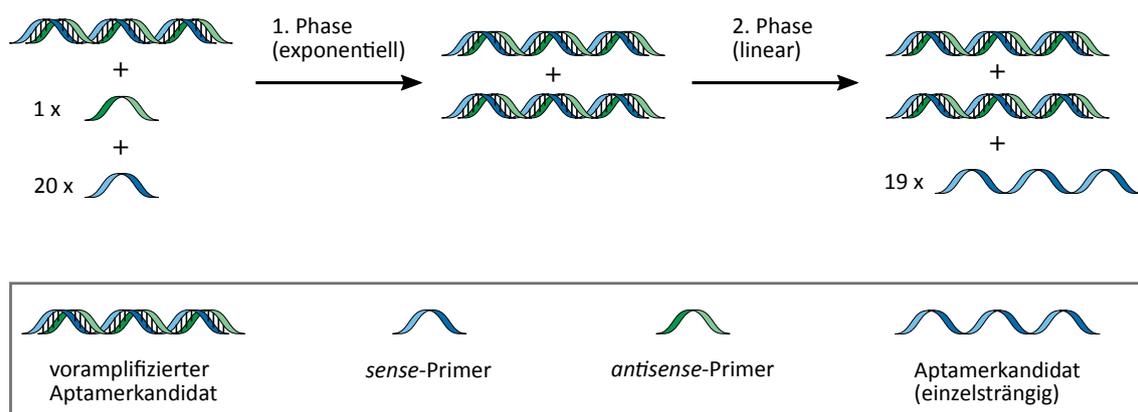


Abb. 2.1.3: Schematische Darstellung der asymmetrischen PCR

Im Reaktionsprodukt der asymmetrischen PCR liegen dann sowohl einzelsträngige Aptamerkandidaten als auch Aptamerkandidaten im Komplex mit ihren komplementären Strängen vor. Die Doppelstränge müssen also nach Abschluss der Reaktion abgetrennt werden, dies geschieht meist elektrophoretisch. Der Durchsatz ist in elektrophoretischen Systemen jedoch stark begrenzt <sup>(52)</sup>. Im Vergleich zur „regulären“ PCR erzeugt eine asymmetrische PCR zudem mehr Fehler <sup>(53)</sup> (siehe: *Amplifikation von Aptamerkandidaten* auf S. 20).

Alternativ zur direkten Erzeugung in einer asymmetrischen PCR können Einzelstränge auch aus konventionellen PCR-Produkten isoliert werden. So können einzelsträngige Aptamerkandidaten beispielsweise während einer Gelelektrophorese aus den doppelsträngigen PCR-Produkten isoliert werden. Im Gegensatz zur reinen Abtrennung der Doppelstränge, die nach der asymmetrischen PCR nötig wird, müssen hier jedoch zunächst die Komplexe mit den komplementären Strängen gespalten und dann die einzelsträngigen Aptamerkandidaten von den nun ebenfalls einzelsträngigen komplementären Strängen abgetrennt werden. Um die komplementären Stränge von den Aptamerkandidaten elektrophoretisch abtrennen zu können werden beispielsweise Primer mit poly(A)-Schwanz oder andere größenmodifizierte Primer eingesetzt (z. B. mit Polyethylenglykol (PEG)), diese führen jedoch häufig zu Problemen während der Amplifikation<sup>(53)</sup>. Alternativ können die komplementären Stränge auch mit modifizierten Primern erzeugt werden, die später eine Immobilisierung durch Copolymerisierung mit der Polyacrylamidmatrix der Elektrophorese erlauben. Jedoch ist der Durchsatz auch für diese Verfahren durch den Einsatz elektrophoretischer Trenntechniken begrenzt<sup>(54)</sup>.

Prominentestes Verfahren für die Isolierung von Einzelsträngen aus doppelsträngigen PCR-Produkten ist die Nutzung eines biotinylierten Primers. Das doppelsträngige PCR-Produkt wird dabei zunächst über den biotinylierten Strang an das Streptavidin einer stationären Phase gebunden. Anschließend werden die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Strängen und den Aptamerkandidaten durch Natronlauge gebrochen und die Aptamerkandidaten gehen in die mobile Phase über. Natronlauge kann jedoch auch die Faltung des Streptavidins und die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin stören und so zur partiellen Freisetzung der eigentlich immobilisierten komplementären Strängen führen<sup>(19, 52)</sup>.

Neben der Abtrennung der komplementären Stränge ist es zudem auch möglich, diese durch Einsatz von Enzymen zu degradieren. Das Enzym  $\lambda$ -Exonuklease besitzt eine etwa 20-fache Spezifität für den phosphorylierten Strang in einem asymmetrisch phosphorylierten Doppelstrang und baut diesen entsprechend bevorzugt

ab<sup>(52)</sup>. Für die Erzeugung von Einzelsträngen wird also ein Primer phosphoryliert, während der andere Primer unmodifiziert eingesetzt wird. Aufgrund der *off-target* Spezifität der  $\lambda$ -Exonuklease für den unphosphorylierten Strang kommt es jedoch auch hier zum partiellen Verdau. Für die Reaktionszeit muss deshalb ein Kompromiss zwischen dem Abbau des komplementären Stranges und dem Abbau der Aptamerkandidaten gefunden werden. Gleichzeitig kann die enzymatische Aktivität durch fehlgepaarte Nukleotide innerhalb des Doppelstrangs behindert werden, in diesem Fall stoppt der enzymatische Abbau, die Folge sind Doppelstränge, die lediglich partiell abgebaut wurden<sup>(22, 53)</sup>. Auch für diese Methode ist der Durchsatz limitiert, da für die nachträgliche Abtrennung der Abbauprodukte und der unvollständig abgebauten Produkte elektrophoretische Verfahren eingesetzt werden.

## 2.2 Molekulare Mechanismen im SELEX-Prozess

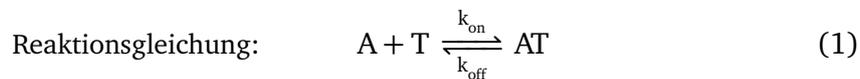
Die zentralen Schritte im Kern des SELEX-Prozesses sind die Selektion und die Amplifikation der Aptamerkandidaten. Beide Prozessschritte sind für den Erfolg der SELEX unerlässlich und vielfältigen Effekten unterworfen.

### 2.2.1 Selektionsdruck

Die Abtrennung der niederaffinen Aptamerkandidaten erfolgt in der SELEX durch anlegen eines Selektionsdrucks. Dieser ist charakterisiert durch die Konkurrenz der Aptamerkandidaten um verfügbare Bindestellen, von der Stringenz der Inkubations- und Waschschrte, sowie durch die Effektivität des jeweiligen Trennverfahrens und sollte innerhalb eines SELEX-Prozesses graduell gesteigert werden<sup>(48)</sup>. Die Stringenz der Inkubations- und Waschschrte ist teilweise direkt mit der Effektivität des Trennverfahrens verknüpft. So sind insbesondere heterogene Trennverfahren auf verschiedene Waschschrte angewiesen.

### Kinetische Aspekte der Selektion

Neben der Affinität eines Aptamers sind auch dessen kinetische Parameter für die Eignung in einem bestimmten Einsatz entscheidend. Das Bindeverhalten von Aptameren (A) an ihr Target (T) kann dabei vereinfacht als Gleichgewichtsreaktion mit der Komplexbildungskonstante ( $k_{\text{on}}$ ) und der Komplexdissoziationskonstante ( $k_{\text{off}}$ ) beschrieben werden (Gl. 1). Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz kann die Änderung der Komplexkonzentration (AT) als Differenz der Bildungsreaktion und der Zerfallsreaktion beschrieben werden (Gl. 2). Durch Umformung wird die Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) erhalten, die als Maß für die Affinität des Aptamers dient und als Quotient von  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  dargestellt werden kann (Gl. 3).



$$\text{Massenwirkungsgesetz: } \frac{d[AT]}{dt} = [A] \cdot [T] \cdot k_{\text{on}} - [AT] \cdot k_{\text{off}} \quad (2)$$

$$\text{Gleichgewichtskonstante: } K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[A] \cdot [T]}{[AT]} \quad (3)$$

Aus diese Betrachtungen kann beispielsweise abgeleitet werden, dass Aptamere für eine Affinitätsreinigung eine niedrige Komplexdissoziationskonstante ( $k_{\text{off}}$ ) aufweisen sollten, damit sich kein bereits immobilisiertes Zielmolekül während einer längeren Beladung oder in den Waschschritten von der Affinitätsmatrix löst. Unter Elutionsbedingungen sollte  $k_{\text{off}}$  dagegen hoch sein, damit das Zielmolekül gut eluiert werden kann <sup>(42)</sup>.

Selektionsdruck kann auch auf die kinetischen Parameter der Aptamerkandidaten ausgeübt werden. Direkter Selektionsdruck auf die Affinität lässt sich lediglich in einem *steady state* Gleichgewicht mit langen Inkubationszeiten zwischen Aptamerkandidaten und Zielmolekülen erreichen. In diesem Zusammenhang wird der Selektionsdruck durch das Verhältnis zwischen Aptamerkandidaten und Zielmolekül definiert und bestimmt die spätere Affinität <sup>(55)</sup>. Dabei ist zu beachten, dass jedes Zielmolekül eventuell mehrere unterschiedliche Bindestellen anbieten kann. Kürzere Inkubationszeiten der Aptamerkandidaten mit den Zielmolekülen können dazu genutzt werden, einen Selektionsdruck auf  $k_{\text{on}}$  auszuüben, während ein Se-

lektionsdruck auf  $k_{\text{off}}$  in Waschschrritten erzeugt und durch deren Länge und Volumen gesteuert werden kann <sup>(13)</sup>.

In konventionellen Trennverfahren müssen die kinetische Aspekte einer Selektion meist durch die Länge der jeweiligen Inkubationsschritte kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu ermöglichen spezielle kapillarelektrophoretische Verfahren die direkte Kontrolle über kinetische Parameter einer Selektion <sup>(9)</sup>. Für diese „kinetischen“ Kapillarelektrophoresen werden die Aptamerkandidaten zunächst mit ihren Zielmolekülen inkubiert, sodass sich ein Gleichgewicht einstellt <sup>(42)</sup>. Anschließend wird dieses Gemisch in eine Kapillare injiziert, deren Puffer eine äquimolare Konzentration an Zielmolekül enthält. Während der Kapillarelektrophorese entsteht dann ein dynamisches Gleichgewicht und die Aptamerkandidaten werden nach ihrer Affinität für das Zielmolekül getrennt (*equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures* (ECEEM)) <sup>(42)</sup>. Alternativ kann das Gemisch der Aptamerkandidaten mit ihren Zielmolekülen in eine Kapillare ohne zusätzliches Zielmolekül injiziert werden (non ECEEM (NECEEM)). Innerhalb dieser Separation liegt der Selektionsdruck dann auf  $k_{\text{off}}$  <sup>(42)</sup>. Durch die elektronische Steuerung der Kapillarelektrophorese und die Sammlung der Aptamerkandidaten in verschiedenen Fraktionen kann für jeden Modus ein vordefinierter Selektionsdruck eingestellt werden <sup>(42)</sup>.

### Selektion auf Spezifität

Anders als in der SELEX ist ein Aptamer in einer konkreten Anwendung stets mit anderen Molekülen neben dem Zielmolekül konfrontiert. Hier ist die Spezifität des Aptamers für sein jeweiliges Zielmolekül entscheidend. Für Aptamere mit entsprechenden Anforderungen kann die Spezifität bereits in der Selektion berücksichtigt werden.

Aptamere mit Affinität zur verwendeten Matrix oder zu den eingesetzten Linkern können durch entsprechende Negativselektionsschritte aus der SELEX entfernt werden <sup>(13, 56)</sup>. Der Einsatz unspezifischer Kompetitoren während des Inkubationsschrittes in der SELEX minimiert zusätzlich unspezifische Bindung an Zielmolekü-

le <sup>(23)</sup>. In Counterselektionen werden dagegen Moleküle präsentiert, die nicht dem Zielmolekül entsprechen diesem aber ähnlich sind, so können Aptamerkandidaten mit *off target* Affinität aus dem SELEX-Prozess entfernt werden <sup>(28)</sup>.

### 2.2.2 Theorie zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

Die Amplifikation von Aptamerkandidaten unterscheidet sich als eine parallele Amplifikation einer Vielzahl von verschiedenen Sequenzen fundamental von einer normalen PCR mit nur einem Amplikon. Werden mehrere unterschiedliche Amplikons mit jeweils unterschiedlicher Sequenz amplifiziert, so handelt es sich um eine multiplex PCR. Auch im SELEX-Prozess werden mehrere Aptamerkandidaten unterschiedlicher Sequenz gleichzeitig amplifiziert, hier weisen die Aptamerkandidaten jedoch zusätzlich eine gewisse Sequenzhomologie auf, die in einer multiplex PCR absichtlich vermieden wird. In dieser so genannten multitemplate PCR kommt es aufgrund der Homologie und der gleichzeitig unterschiedlichen Nukleotidzusammensetzungen der Amplikons zu vielfältigen Effekten, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

#### **PCR-Bias**

Ein Nukleotid-Bias gegen GC reiche Regionen ist schon in regulären PCRs zu beobachten, hier führen Templates mit hohem GC-Gehalt zu Schwierigkeiten in der Amplifikation. In einer normalen PCR kann auf diese Problematik durch eine Optimierung der Reaktionsparameter oder durch Zugabe von *PCR-Enhancern* reagiert werden.

In einer multitemplate PCR gelten jedoch die Reaktionsbedingungen für alle Templates, sodass hier je nach Reaktionsbedingungen Amplikons entsprechend bevorzugt oder benachteiligt werden <sup>(57-61)</sup>. Der Nukleotid-Bias kann jedoch durch Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen eingegrenzt werden <sup>(58)</sup>. Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass Polymerasen bei ihrem Priming bestimmte Sequenzmotive bevorzugen (Priming-Bias) <sup>(62)</sup>. Auch für die Erzeugung von RNA-Aptameren aus DNA in einer Transkription wurde ein Nukleotid-Bias nach-

gewiesen, dieser ist jedoch weit weniger untersucht und die gezeigten Daten sind teilweise widersprüchlich <sup>(59, 63)</sup>.

Neben der reinen Sequenzzusammensetzung sind besonders strukturierte Regionen eine Ursache für den PCR-Bias in einer multitemplate PCR. So werden strukturell schwache Aptamerkandidaten während der Amplifikation bevorzugt <sup>(17)</sup>. Sekundärstrukturen, insbesondere *Loop* Strukturen die auch während der Elongationsphase stabil sind, führen zum Stopp der Polymeraseaktivität und zum Ablösen der Polymerase vom unvollständigen Amplikon oder zur Aktivierung der eventuell vorhandenen 5' Nukleaseaktivität (*proofreading* Enzyme), die dann beginnt diese Strukturen abzubauen und den jeweiligen Aptamerkandidat dabei zerstört <sup>(57, 61)</sup>.

### Effekte hoher Diversität

Auch die hohe Diversität innerhalb der Bibliothek der Aptamerkandidaten hat Einfluss auf die Amplifikation. Gegenüber häufigeren Amplikons werden Amplikons mit signifikant niedrigerer Konzentration benachteiligt <sup>(61, 64)</sup>.

Eine große Diversität in der Bibliothek führt zudem besonders bei hohen Konzentrationen zur Bildung von Heteroduplexen eines Aptamerkandidates mit einem anderen Aptamerkandidaten oder einem nichtkomplementären Gegenstrang <sup>(40, 65)</sup>. Dies führt wiederum zur vermehrten Bildung von nicht komplett amplifizierten Produkten oder Nebenprodukten <sup>(61)</sup>.

In einer konventionellen PCR sind Primer-Primer-Hybridisierung oder fehlerhaftes Annealing der Primer an das Template die häufigste Ursache für Nebenprodukte <sup>(57, 66)</sup>, aber auch zu große Mengen an Polymerase in der Reaktion ermöglichen die Entstehung von Nebenprodukten <sup>(64)</sup>. Im Gegensatz dazu entstehen in einer multitemplate PCR die Nebenprodukte vorwiegend über Produkt-Produkt-Hybridisierung zwischen den homologen Teilbereichen der jeweiligen Amplikons, dabei entstehen häufig chimäre Moleküle und Nebenprodukte, die eine abweichende Länge aufweisen <sup>(57, 65, 67)</sup>. Hybridisiert beispielsweise die randomisierte Region eines Aptamerkandidaten innerhalb einer randomisierten Region eines anderen Aptamerkandidaten kann der angelagerte Strang von der Polymerase jeweils als

## Theoretische Grundlagen der Aptamerelektion

Primer genutzt werden und es entstehen Nebenprodukte die ihrerseits wieder die Möglichkeit zur Fehlhybridisierung mit anderen Aptamerkandidaten haben. Auf diese Weise können Nebenprodukte mit jeweils aufsteigender Größe erzeugt werden, die daher auch dem *ladder type* zugeordnet werden (vgl. Abb. 2.2.1) <sup>(66)</sup>. Alternativ erfolgt die Fehlhybridisierung zwischen der zentralen Region eines Aptamerkandidaten und der Primerregion eines anderen Aptamerkandidaten. Wiederum werden die fehlhybridisierten Stränge von der Polymerase als Template erkannt, das entstehende Produkt kann jedoch keine erneute Fehlhybridisierung eingehen, die zu einer weiteren Verlängerung führen würde, daher werden diese Nebenprodukte in die Gruppe des *non ladder type* eingeordnet <sup>(66)</sup>.

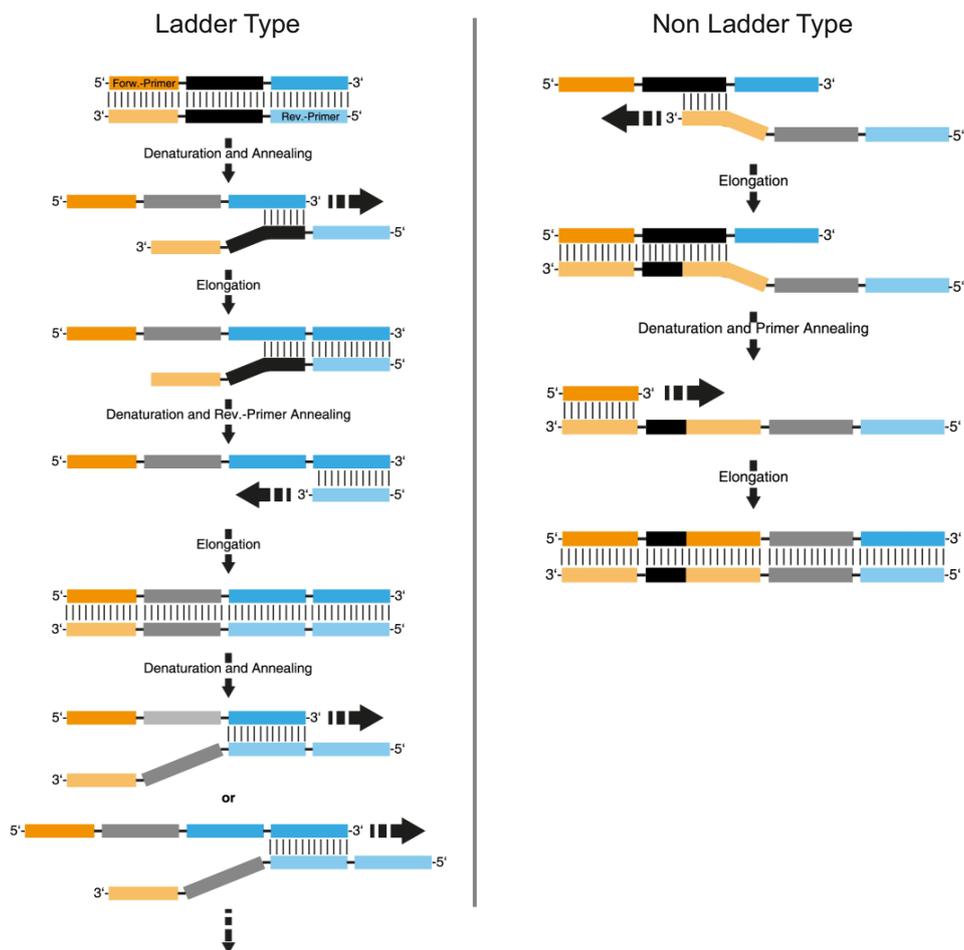


Abb. 2.2.1: Schematische Darstellung der Entstehung von *ladder type* und *non ladder type* Nebenprodukten in einer multitemplate PCR <sup>Abbildung aus (66)</sup>

Weitere Ursachen für die Entstehung von Nebenprodukten in einer multitemplate PCR sind unvollständige Amplifikationen durch spontane Dissoziation der Polymerase vom Template oder durch *Template Switching* der Polymerase auf fehlerhaft angelagerte Stränge während der Polymerisation<sup>(61)</sup>. Bei Einsatz von *proofreading* Polymerasen können zudem auftretende Heteroduplexe von diesen Polymerasen partiell abgebaut werden<sup>(61)</sup>. Insgesamt ist die Wahrscheinlichkeit zur Nebenproduktbildung oder zu anderen PCR-Fehlern wesentlich von der Sequenzdiversität in der jeweiligen Probe abhängig. Dabei neigen längere randomisierte Bereiche eher zur Nebenproduktbildung, als kurze<sup>(57)</sup>.

Fehler in der PCR und PCR-Bias haben negative Auswirkungen im SELEX-Prozess. So beruht der SELEX-Prozess darauf, Aptamerkandidaten lediglich aufgrund ihrer Affinität für das Zielmolekül anzureichern, während der PCR-Bias dieser Anreicherung möglicherweise entgegensteht, da affine Aptamerkandidaten in der Amplifikation teilweise benachteiligt werden können<sup>(63, 68)</sup>. Ein Selektionsdruck auf Aptamerkandidaten während der Amplifikation soll daher vermieden werden.

### **Kompartimentierte PCR (Emulsions-PCR)**

Hauptursache für die Entstehung von Nebenprodukten und Benachteiligung von Sequenzen mit niedriger Konzentration ist die hohe Diversität in der Probe. Eine Kompartimentierung des Reaktionsraums kann die Diversität innerhalb des jeweiligen Kompartiments senken und minimiert so die Konkurrenz zwischen den Amplikons und die Wahrscheinlichkeit für chimäre Nebenprodukte<sup>(61)</sup>. Im Optimalfall bedeutet dies einen eigenen Reaktionsraum für jeden Aptamerkandidaten. Die Emulsions-PCR ist eine Methode, die diese Kompartimentierung durch aufteilen des Reaktionsvolumens in viele kleine wässrige Tröpfchen in einer organischen Umgebung erreicht (vgl. Abb. 2.2.2).

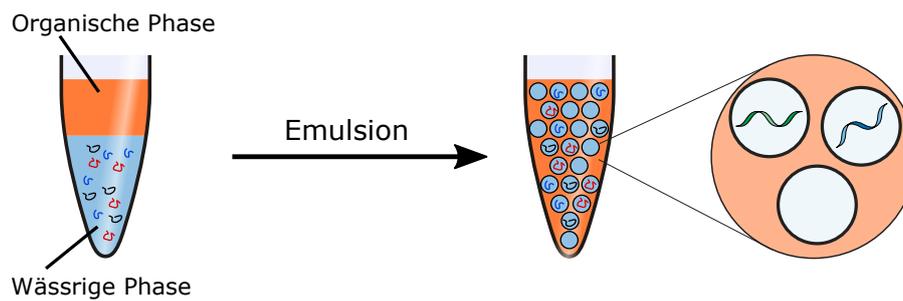


Abb. 2.2.2: Schematische Darstellung der Emulsions-PCR; Aptamerkandidaten werden einzeln in Tröpfchen eingeschlossen

Die Tröpfchen werden dabei von einer organischen Phase umgeben, die keinen Stoffaustausch zwischen den individuellen Kompartimenten erlaubt. Dadurch wird die Entstehung von Nebenprodukten unterdrückt <sup>(67)</sup>. So können auch Bibliotheken mit großer Sequenzvielfalt amplifiziert werden, ohne dass diese Sequenzvielfalt signifikant gemindert wird <sup>(56)</sup>. Der PCR-Bias, der durch die unterschiedliche Nucleotidzusammensetzung oder durch strukturelle Motive innerhalb der Amplikons entsteht, bleibt jedoch auch in einer Emulsions-PCR bestehen <sup>(61)</sup>.

### 2.3 Analytik für SELEX-Prozesse

Der SELEX-Prozess ist ein vielstufiges, zyklisches Selektionsverfahren, das theoretisch ins Unendliche fortgeführt werden könnte und mathematisch zu einer einzelnen Sequenz konvergiert. In der Realität sollen jedoch möglichst viele hochaffine Aptamerkandidaten isoliert werden, die anschließend abhängig von ihren Eigenschaften Verwendung finden sollen. Ohne Einblicke in den Fortschritt der SELEX ist es jedoch schwierig den optimalen Punkt für das Selektionsende festzulegen. Deswegen sollte ein SELEX-Prozess engmaschig überwacht werden. Wesentliche Parameter sind dabei Änderungen der Ein- und Ausgangsbilanzen der Selektions-schritte, die Abnahme der Sequenzdiversität in der Bibliothek der Aptamerkandidaten sowie die Änderung der mittleren Affinität im Verlauf des SELEX-Prozesses.

### 2.3.1 Überwachung der Oligonukleotid–Stoffmengen

Die einfachste Methode zur Überwachung eines SELEX–Prozesses ist die Messung der Stoffmengen an Aptamerkandidaten über die verschiedenen Prozessschritte. So erlauben die Bilanzen der Selektionsschritte Einblicke in den angelegten Selektionsdruck und die Effektivität des verwendeten Trennverfahren. Auch der Erfolg der Amplifikation kann auf diese Weise bestätigt werden.

Eine Möglichkeit der Quantifizierung der Aptamerkandidaten bietet die Radiographie nach Markierung der Aptamerkandidaten mit dem Isotop  $^{32}\text{P}$ , dabei bleibt die Struktur der Aptamerkandidaten erhalten. Die notwendigen Maßnahmen zum Strahlenschutz erschweren jedoch die Anwendung einer radioaktiven Markierung, die ansonsten eine hohe Sensitivität erlaubt <sup>(12)</sup>. Alternativ werden die Aptamerkandidaten fluoreszent markiert, diese Markierung kann jedoch mit der nativen Faltung der Aptamerkandidaten interferieren <sup>(13)</sup>. Ein markierungsfreies Quantifizierungsverfahren ist die spektroskopische Absorptionsmessung im UV/VIS Bereich. Diese Messungen sind jedoch aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität kaum geeignet. PCR basierte Verfahren wie die Real Time PCR können dagegen auch bei sehr kleinen Konzentrationen an Aptamerkandidaten eingesetzt werden <sup>(13)</sup>. Problematisch für die Real Time PCR sind dabei die Entstehung von Nebenprodukten und Probleme, die durch Sequenzdiversität entstehen (siehe: *Effekte hoher Diversität* auf S. 21). Eine Weiterentwicklung der Real Time PCR stellt die *digital droplet PCR* (ddPCR) dar. Ähnlich zur Emulsions–PCR wird hier die wässrige Phase in Tröpfchen kompartimentiert. Für eine schmale Größenverteilung der Tröpfchen kann die Poisson–Verteilung für die Verteilung der Aptamerkandidaten in die Tröpfchen angenommen werden. Nach der PCR werden die Anzahl der DNA–enthaltenden (positiven) und nicht DNA–enthaltenden (negativen) Tröpfchen in einem FACS–ähnlichem Zählvorgang gezählt. Aus dem Verhältnis von positiven zu negativen Tröpfchen kann dann die Anfangskonzentration während der Kompartimentierung der Probe errechnet werden <sup>(22)</sup>.

### 2.3.2 Bestimmung der Sequenzdiversität

Zusätzlich zur reinen Massenbilanz kann auch die Sequenzdiversität der Aptamerkandidaten innerhalb der Bibliothek verfolgt werden. Die Bestimmung erfolgt dabei nach der Amplifikation und noch vor der Generierung neuer einzelsträngiger Aptamerkandidaten, da die Diversitätsmessungen nur im Gemisch mit den komplementären Strängen erfolgen kann.

Als Maß für die Sequenzdiversität kann unter anderem die Konzentration an doppelsträngiger DNA (dsDNA) in Relation zur Gesamtkonzentration aller Oligonukleotide in der Probe dienen. Dabei sinkt der Anteil doppelsträngiger DNA bei ansteigender Diversität in der Probe. Die Konzentration an dsDNA kann mit einem sättigenden dsDNA Farbstoff bestimmt werden <sup>(22)</sup>. Alternativ können die Anteile von Homo- und Heteroduplexen direkt in der Schmelzkurve nach einer Real Time PCR ermittelt werden <sup>(22)</sup>. Dieses Verfahren berücksichtigt jedoch nicht, dass die PCR zum Ende ihrer Reaktion eine Plateauphase erreicht, in der keine Amplifikation mehr stattfindet.

Weitere Verfahren beruhen auf der veränderten Hybridisierungskinetik für Proben mit hoher Sequenzdiversität ( $C_0t$  Analyse). Hierbei ist das Annealing von DNA-Strängen verlangsamt, wenn die Probe eine hohe Sequenzvielfalt aufweist <sup>(69)</sup>. Die Anwendung der  $C_0t$  Analyse im SELEX-Prozess ist jedoch durch ihre niedrige maximale Diversität begrenzt, die von SELEX-Proben um ein Vielfaches überschritten wird (kein  $C_0 t_{1/2}$  messbar) <sup>(70)</sup>. Im Gegensatz dazu kann jedoch das Schmelzen der partiell hybridisierten Stränge in einer Schmelzkurve gemessen werden (*remelting analysis*) <sup>(40, 70)</sup>. Im Unterschied zur direkten Schmelzkurve nach der PCR wird hier die Probe zuvor absichtlich denaturiert, damit zunächst alle Stränge voneinander getrennt werden. In der Rehybridisierungsphase lagern sich die Proben dann entsprechend ihrer Diversität zu Homo- und Heteroduplexen zusammen, die anschließend in der Schmelzkurve untersucht werden. Um die erhaltenen Messdaten entsprechenden Diversitäten zuordnen zu können wurden für diese Verfahren Diversitätsstandards konstruiert <sup>(70, 71)</sup>.

Neben den Verfahren zur Schätzung der Sequenzdiversität ist es auch möglich, die Sequenzdiversität in *next generation sequencing* (NGS) Verfahren direkt zu bestimmen. Dabei werden die Aptamerkandidaten nach einer Selektionsrunde sequenziert und bioinformatisch analysiert. Neben der Information über die einzelnen Sequenzen kann auch deren Häufigkeit (Frequenz) erfasst werden und „Familien“ von Aptamerkandidaten mit verschiedenen Sequenzmotiven angelegt werden <sup>(72)</sup>. So nimmt die Anzahl an wiederkehrenden Sequenzen im Verlauf des SELEX-Prozess zunächst zu <sup>(56)</sup>. Ab einem bestimmten Punkt nimmt dann die Anzahl der Sequenzfamilien mit jedem Selektionszyklus ab, während die jeweilige Frequenz der verbliebenen Familien steigt <sup>(56)</sup>.

NGS Verfahren erlauben also sowohl die Messung der Sequenzdiversität als auch Analysen über das Verhalten einzelner Sequenzfamilien oder Aptamerkandidaten. In diesem Zusammenhang ist es möglich, hochaffine Aptamere über ihre Anreicherungsrate von Zyklus zu Zyklus zu detektieren, auch wenn die entsprechenden Aptamerkandidaten nur in geringer Häufigkeit vorkommen <sup>(17, 37, 56, 68, 73, 74)</sup>. Diese Analyse ist besonders geeignet für die Identifizierung von Aptameren, die während der Amplifikation stark benachteiligt werden <sup>(17, 52)</sup>. Gleichzeitig ermöglichen NGS-Verfahren in Kombination mit Counterselektionen oder Negativselektionen Einblicke in das Verhalten der Sequenzmotive unter veränderten Selektionsbedingungen <sup>(8)</sup>.

### 2.3.3 Bestimmung der mittleren Affinität

Ein weiterer Parameter zur Überwachung der fortschreitenden Selektion ist die mittlere Affinität der Aptamerkandidaten. Durch das Ausscheiden niederaffiner Sequenzen erhöht sich die mittlere Affinität im Verlauf des SELEX-Prozesses kontinuierlich <sup>(75)</sup>. Zur Messung der mittleren Affinität werden meist klassische Verfahren zur Affinitätsmessung eingesetzt wie *MicroScale Thermophoresis* (MST), *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* (SPR), *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS), *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), *Capillary Electrophoresis* (CE), Chromatographie oder Fluorometrie <sup>(13, 30)</sup>. Die meisten Affinitätsmessungen sind je-

doch mit großem Aufwand verbunden und werden daher nur selten zur Überwachung des Selektionsfortschritts angewandt, sondern erst später zur Evaluierung selektierter Aptamere herangezogen.

### 2.4 Unsicherheit der SELEX und fehlgeschlagene Selektionen

Trotz der vielen modernen Verfahren ist der SELEX-Prozess stets mit Unsicherheiten behaftet und nicht jede Selektion gelingt. Für konventionelle SELEX-Prozesse liegt die Erfolgchance lediglich bei etwa 30 % <sup>(36)</sup>. Ursächlich für fehlgeschlagene Selektionen sind beispielsweise die unspezifische Interaktion der Aptamerkandidaten mit ihren Zielmolekülen (meist elektrostatisch) oder die Bindung an die Matrix, auf der das Zielmolekül immobilisiert wurde <sup>(22)</sup>. Diese unspezifischen Interaktionen führen gemeinsam mit dem PCR-Bias zur Unterwanderung der Selektion durch niederaffine Aptamerkandidaten <sup>(56)</sup>. Auch das eingesetzte Trennverfahren hat Einfluss auf die Erfolgchance der Selektion, gerade Selektionsverfahren mit niedrigen Effektivitäten erlauben oft die Anreicherung schwach affiner Aptamerkandidaten <sup>(22)</sup>. Neben den Trennverfahren spielt auch der Selektionspuffer und eventuell eingesetzte Kompetitoren eine wichtige Rolle bei der Minimierung unspezifischer Interaktionen. Der Selektionspuffer sollte dabei auf die späteren Anwendungsbedingungen des Aptamers abgestimmt sein <sup>(31, 36)</sup>. Zusätzlichen Einfluss auf die Erfolgchance haben auch die Eigenschaften des Zielmoleküls, dieses sollte über genügend Möglichkeiten zur Interaktion mit den Aptamerkandidaten verfügen und strukturell ausreichend stabil sein (siehe: *Notwendige Eigenschaften der Zielmoleküle* auf S. 10). Daneben sind Aptamere insbesondere bei der Art der Interaktionen mit ihren Zielmolekülen hauptsächlich auf ladungsgetriebene Interaktionen angewiesen, ein Umstand der sich durch den Einsatz modifizierter Nukleotide beheben lässt. Moderne SELEX-Varianten mit artifiziellen Nukleotiden und engmaschiger Überwachung haben eine Erfolgsaussicht von etwa 75 % <sup>(27)</sup>. Mathematische Analysen haben zudem gezeigt, dass der Erfolg einer Selektion wesentlich von der initialen Affinitätsverteilung, dem gewählten Trennverfahren

## Theoretische Grundlagen der Aptamere Selektion

---

und dessen Stringenz abhängig ist <sup>(76)</sup>. So sollte der angelegte Selektionsdruck und die SELEX in ihren Teilschritten engmaschig überwacht werden, um die Erfolgsaussichten der SELEX zu steigern. Für den Aufbau und die Erprobung einer Analytik für die SELEX wurde in dieser Arbeit eine Modell-SELEX konzipiert, die anschließend in ihren Teilschritten untersucht wurde.

### 3 Experimente zur Selektion von Aptameren

Die SELEX beruht auf vielen Einzelschritten, die ursprünglich jeweils für andere Zwecke entwickelt wurden. Daher müssen die einzelnen Verfahren aufeinander abgestimmt werden, damit diese untereinander kompatibel sind. Für die Beurteilung des Erfolgs und die Optimierung der Teilschritte der SELEX müssen zudem geeignete Verfahren für die Analytik etabliert werden (siehe: *Analytik von Aptamerkandidaten* auf S. 39).

Auf dem Weg zu einer kompletten SELEX wurde eine „minimale“ SELEX entworfen, in die lediglich die notwendigen Prozessschritte für eine Selektion von Aptameren aufgenommen wurden. Zunächst mussten die nötigen Ausgangsmaterialien bereitgestellt werden (siehe: *Herstellung der Ausgangsmaterialien* auf S. 31). Der Einfachheit halber wurden auf Magnetpartikeln immobilisierte Hexahistidin-Tag-Proteine (His-Tag-Proteine) als Zielmoleküle für die „minimale“ SELEX eingesetzt, da für diese Trenntechnik keine aufwendige Laborausrüstung benötigt wird. Die Amplifikation der Aptamerkandidaten erfolgte in einer PCR, an die sich die Abtrennung der komplementären Stränge anschließt (siehe: *Amplifikation der Aptamerkandidaten* auf S. 58 und *Gewinnung einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus PCR-Produkten* auf S. 63).

Nach der Optimierung der Teilschritte wurde die „minimale“ SELEX als eine *de novo* Selektion gegen His-Tag-Proteine eingesetzt, um das Zusammenspiel der Teilschritte zu untersuchen (siehe: *Proof of principle für den minimalen SELEX-Prozess* auf S. 70). Auch die Eignung der Analytik für die Verfolgung des Selektionsfortschritts wurde untersucht.

Anschließend wurde eine Selektion gegen das Protein ATP7B durchgeführt, wobei die Selektion wegen unerwarteter Artefakte in der Amplifikation der Aptamerkandidaten früh scheiterte (siehe: *Anwendung des minimalen SELEX-Prozesses und dessen Begrenzungen* auf S. 81). Es konnte reproduzierbar nachgewiesen werden, dass diese Artefakte auf die hohe Sequenzdiversität der Aptamerkandidaten zu-

rückgeführt werden kann. In einer erneuten SELEX gegen ATP7B konnte die Entstehung von Artefakten durch Integration der EmulsionsPCR in die SELEX effektiv verhindert werden (siehe: *Überprüfung der Anwendbarkeit der optimierten SELEX auf S. 92*).

### 3.1 Erstellung eines Modell-SELEX-Prozesses

Ähnlich wie reale Selektionsprozesse muss der Modellprozess gegen ein Zielmolekül gerichtet sein. Als Target für den Aufbau des SELEX-Prozesses wurde hier der Hexahistidin-Tag (His-Tag) ausgewählt. Dieser Tag findet in der Biotechnologie breite Verwendung für affinitätsbasierte Aufreinigung von rekombinanten Proteinen und ist somit ein leicht zugängliches und gut charakterisiertes Ziel. Gleichzeitig sind bereits mehrere Aptamere gegen den His-Tag in der Literatur beschrieben, die als Kontrolle für das zu erwartende Verhalten von Aptamerkandidaten eingesetzt werden können. Als Modellaptamer dient hier das Aptamer 6H7 mit einer  $K_d$  von  $4,6 \mu\text{M}$  <sup>(77, 78)</sup>.

#### 3.1.1 Herstellung der Ausgangsmaterialien

Zu Beginn des Modellprozesses müssen zunächst immobilisierte Zielproteine mit His-Tag, Aptamerkandidaten und entsprechende Puffer bereitgestellt werden. Zusätzlich muss zusätzlich eine leistungsstarke Analytik aufgebaut werden, um den Erfolg der Vorarbeiten und der einzelnen Teilschritte der SELEX zu beurteilen. Auch die Überprüfung des eingestellten Selektionsdrucks und die Beobachtung des Selektionsfortschritts sind wichtige Anwendungen der Analytik.

#### **Produktion und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen**

Da der His-Tag bei vielen Proteinen für die Affinitätsreinigung genutzt wird, konnte auf verfügbare Konstrukte zurückgegriffen werden, die bereits in anderen Projekten verwendet wurden <sup>(78)</sup>. Hierbei handelt es sich um vier Esterasen unterschiedlichen bakteriellen Ursprungs, die jeweils als Fusionsprotein mit einem His-Tag ausgestattet sind (vgl. Tab. 3.1.1).

Tab. 3.1.1: Produzierte His-Tag-Proteine

<b>Protein</b>	<b>Kürzel</b>	<b>Molekulargewicht</b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I	PFEI-His	30 kDa
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	SubE-His	32 kDa
<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase	pNBE-His	54 kDa
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase	BSTE-His	31 kDa

Die Gene für die Esterasen liegen jeweils auf dem Plasmid pJOE2792 unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Operons. Das Plasmid verfügt über eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. In den vorangegangenen Projekten diente *Escherichia coli* K12 als Produzent für die His-Tag-Proteine. Im Anschluss an die Anzucht der transformierten Bakterien in *lysogeny broth* Medium (LB) mit Ampicillin erfolgte die Produktion der Esterasen bei einer Rhamnosekonzentration von 0,2 % (w/v). Die Esterasen werden nicht sekretiert und verbleiben daher im intrazellulären Raum. Nach 24 h wurde die Proteinproduktion beendet und die Bakterien durch Zentrifugation geerntet.

### Zellaufschluss

Da Aptamere sensibel auf Strukturänderungen am oder nahe ihrer Bindestelle reagieren, muss die anschließende Isolation der Proteine möglichst schonend erfolgen um die native Struktur der Proteine zu erhalten. Obwohl dies für die His-Tag-Proteine zunächst von nachgeordneter Bedeutung ist, sollte die Eignung des Verfahrens auch für andere Zielproteine geprüft werden, die weniger robust sind. Da Enzyme oder Detergenzien möglicherweise nicht rückstandslos entfernt werden können oder Modifikationen an den Proteinen hinterlassen könnten, können für den Zellaufschluss jedoch auch keine chemischen oder enzymatischen Verfahren eingesetzt werden.

Ein prominentes mechanisches Verfahren stellt der Aufschluss mit Ultraschall dar. Aber auch der Einsatz von Ultraschall kann unerwünschte Änderungen der Proteinstrukturen zur Folge haben <sup>(79, 80)</sup>. Um den Zellaufschluss so schonend wie möglich zu gestalten, wurde die Einwirkzeit des Ultraschalls auf insgesamt 2,5 min begrenzt und nach je 30 Sekunden von Reaktionspausen (30 s) unterbrochen, in denen die erzeugte Wärme durch Kühlung mit Eis aus der Probe abgeführt wurde. Im Anschluss an den Zellaufschluss müssen die Zielproteine von anderen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Weil die Aptamerselektion durch Anwesenheit von Nicht-Zielmolekülen unterwandert werden kann, sollten Verunreinigungen möglichst vollständig abgetrennt werden. Die Präparation der Zielmoleküle steht also im Spannungsfeld zwischen der geforderten Reinheit und der sich ergebenden Ausbeute. Gleichzeitig muss auch die Aufreinigung schonend erfolgen, sodass weder chaotrope Salze noch stark hydrophobe Phasen eingesetzt werden können.

Ein klassisches Verfahren für die Aufreinigung von Proteinen im halbtechnischen Maßstab ist die *fast protein liquid chromatography* (FPLC), die auch bei Einsatz wässriger Phasen gute Trennleistungen erreicht. Für die hier verwendeten His-Tag-Esterasen wurde eine Aufreinigung in einer Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt. Eine IMAC basiert dabei auf der Affinität des His-Tags zu Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisierten Metallionen, gebundene His-Tag-Proteine können mit Imidazol eluiert werden.

Da in einer klassischen IMAC auch Proteine aus dem *Host*-Organismus *E. coli* an die stationäre Phase binden können, wurde das NTA-Chromatographiematerial hier mit Cobalt- statt mit Nickel-Ionen geladen, die im Komplex eine niedrigere Affinität für His-Tag-Proteine aufweisen. Zusätzlich wurde bereits dem Bindepuffer eine geringe Menge Imidazol beigemischt (30 mM), um weitere niederaffine Bindungen an die stationäre Phase auszuschließen. Die His-Tag-Proteine wurden abschließend mit Imidazol kompetitiv eluiert, wobei Hilfsstoffe wie Imidazol und andere Pufferbestandteile in einer späteren Dialyse wieder aus der Proteinlösung entfernt wurden.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Die Reinheit der so erhaltenen Proteine ist für eine Anwendung im SELEX-Prozess jedoch noch zu niedrig, sodass im Anschluss an die erste IMAC eine zweite IMAC und eine Ionenaustausch-Chromatographie (IEX) durchgeführt wurden. Nach Abschluss aller Prozessschritte konnten so Proteinmengen im niederen mg-Maßstab bei einer densitometrisch geschätzten Reinheit von nahe 100 % bereitgestellt werden (vgl. Tab. 3.1.2).

Tab. 3.1.2: Densitometrisch geschätzte Reinheit der produzierten Proteine nach dem jeweiligem Prozessschritt

	<b>BSTE-His</b>	<b>PFEI-His</b>	<b>pNBE-His</b>	<b>SubE-His</b>
IMAC 1	28,2 %	64,9 %	22,1 %	41,5 %
IMAC 2	83,6 %	100,0 %	95,7 %	88,6 %
IEX	86,1 %	100,0 %	—	100,0 %

### Immobilisierung der His-Tag-Proteine

Die Immobilisierung von Zielmolekülen ist im SELEX-Prozess ein entscheidender Faktor für die späteren Bindeeigenschaften des Aptamers. Eine chemische Aktivierung und anschließende Immobilisierung der Proteine ist kritisch zu bewerten, da diese Aktivierung auf der gesamten Proteinoberfläche Modifikationen einführen würde, sodass sich die Selektion gegen nicht-native Proteine richten würde. Gleichzeitig dürfen die Proteine nicht über ihren His-Tag an chelatbildende Materialien immobilisiert werden, weil der His-Tag während der Selektion als Zielstruktur für die Aptamere dienen soll. Für eine erfolgreiche Selektion müssen die Bindestellen für Aptamere zugänglich auf der Oberfläche liegen, sodass die Komplexbildung mit dem Aptamer nicht durch sterische Effekte gehindert wird.

Eine andere Möglichkeit zur Immobilisierung besteht darin, eine Reaktion zwischen einer voraktivierten Oberfläche der stationären Phase und dem nativen Protein für die Immobilisierung zu nutzen. Dabei werden die Bindestellen des Zielmoleküls teilweise durch die Kopplung an die Matrix verdeckt. Die verdeckten Binde-

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

stellen werden jedoch von anderen Zielmolekülen präsentiert, da die Orientierung der Zielmoleküle während der Immobilisierung zufällig ist.

Im diesem Modellprozess wurden die Proteine auf Magnetpartikeln immobilisiert. Magnetpartikel bieten verschiedene Vorteile gegenüber anderen stationären Phasen. So verteilen sie sich gleichmäßig in einer Lösung, wobei die homogene Verteilung der Magnetpartikel in der Suspension es zudem ermöglicht, eine definierte Menge an Magnetpartikeln und immobilisierten Zielmolekülen zu entnehmen. Dies ist insbesondere für die Steuerung der Menge an Zielmolekülen im Verlauf des Selektionsprozesses entscheidend. Gleichzeitig lassen sich die Magnetpartikel aufgrund ihres Paramagnetismus (induzierter Magnetismus) in einem Magnetfeld leicht von der Lösung abtrennen und ermöglichen so scharf definierte Inkubationszeiten.

Für die Immobilisierung der Target-Proteine in diesem Modellprozess wurden tosylierte Magnetpartikel mit einer Polystyrol-Beschichtung eingesetzt. Diese Beschichtung soll unspezifische, landungsgetriebene Interaktionen der Magnetpartikel-Oberfläche mit Aptamerkandidaten vermeiden (Hintergrundbindung). Die Immobilisierung der Proteine erfolgt dabei über die primären Amine der Seitenketten von Asparagin und Glutamin des Zielproteins, die hier in einer nukleophilen Substitution mit der aktivierten Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren (vgl. Abb. 3.1.1).

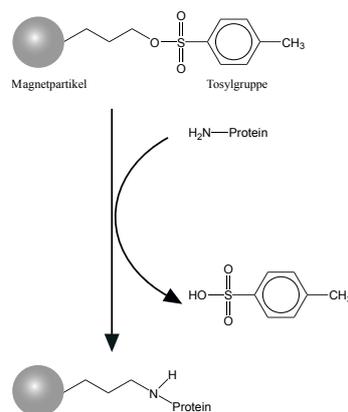


Abb. 3.1.1: Immobilisierung von Proteinen auf tosylaktivierten Magnetpartikeln

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Im SELEX-Prozess ist die Immobilisierungsdichte ein wichtiger Parameter, da sie großen Einfluss auf die Proteinstruktur und die resultierenden Charakteristika der Oberfläche hat, die den Aptamerkandidaten während der Selektion präsentiert wird (siehe: *Heterogene Trennverfahren* auf S. 11). Für die eingesetzten Magnetpartikel wurde zunächst die maximale Immobilisierungsdichte bestimmt. Dazu wurden die Magnetpartikel mit verschiedenen Proteinmengen BSTE-His inkubiert und die resultierenden Immobilisierungsdichten bestimmt (vgl. Abb. 3.1.2).

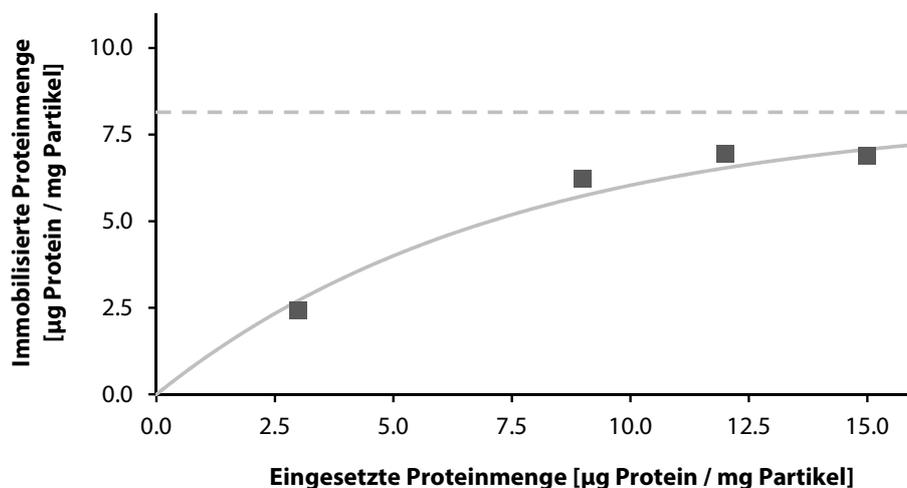


Abb. 3.1.2: Bestimmung der maximalen Immobilisierungsdichte tosylaktivierter Magnetpartikel (Bestimmung exemplarisch mit BSTE-His)

Die Immobilisierungsdichte steigt mit zunehmender eingesetzter Proteinmenge an und lässt sich in diesem Modellprozess gut über die eingesetzte Proteinkonzentration steuern. Unter Annahme eines limitierten exponentiellen Verlaufs liegt die maximale Immobilisierungsdichte bei etwa 8,2 µg Protein pro mg Magnetpartikel. Da in diesem Modellprozess der His-Tag als Zielstruktur dient, ist die globale Tertiärstruktur der immobilisierten Proteine von untergeordneter Bedeutung, gleichzeitig jedoch soll eine zu hohe Immobilisierungsdichte und damit verbundene nachteilige Effekte vermieden werden. Daher wurde für diesen Modellprozess eine mittlere Immobilisierungsdichte von 6,0 µg Protein pro mg Magnetpartikel gewählt.

Proteine die auf Magnetpartikeln immobilisiert sind, lassen sich über einen begrenzten Zeitraum lagern. Um die Konformation der immobilisierten Proteine zu



### Selektionspuffer

Bereits vor Beginn der Selektion sollten die wesentlichen Einsatzparameter der Aptamere festgelegt werden. Dies gilt neben dem definierten Zielmolekül besonders für die Spezifikationen des Puffers, in dem die Aptamere später zur Anwendung kommen sollen. Weil die Faltung von Aptameren maßgeblich von ihrer chemischen Umgebung abhängig ist, sollten sie am besten innerhalb derselben chemischen Umgebung selektiert werden, in der später ihre Anwendung vorgesehen ist. So sollte der Selektionspuffer einen ähnlichen pH-Wert, sowie eine ähnliche Ionen-Stärke und -Komposition aufweisen und den Aptameren später so ihre korrekte Faltung ermöglichen.

Für diesen Modellprozess besteht der Selektionspuffer aus der Pufferkomponente Kaliumhydrogenphosphat und wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Neben der pH-puffernden Eigenschaft des Phosphats dienen die Kaliumionen zur Stabilisierung eventuell vorhandener G-Quadruplex-Strukturen. Zweiwertige Metallionen (Magnesium und Calcium, jeweils als Chlorid) ermöglichen den Aptamerkandidaten eine zusätzliche Stabilisierung von Sekundärstrukturen. Zur Verminderung unspezifischer elektrostatischer Interaktionen zwischen den Aptamerkandidaten und den lokal positiv geladenen Oberflächen der immobilisierten Proteine wurde dem Puffer Natriumchlorid zugesetzt. Hydrophobe Interaktionen sollen durch den Einsatz von Tween 20 vermindert werden. Zur weiteren Reduktion von unspezifischen Bindungen zwischen Aptamerkandidaten und Zielproteinen wurden dem Puffer zusätzlich das Protein BSA und das DNA-ähnliche Hetero-Copolymer Poly(deoxyinosyl-deoxycytidyl)-Säure (poly(dI-dC)) als Kompetitoren zugesetzt (vgl. Tab. 3.1.3).

Tab. 3.1.3: Bestandteile und Funktion des Selektionspuffers im Modellprozess

Komponente	Konzentration	Funktion
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	Phosphat als Puffersubstanz; Kalium zur Stabilisierung von G–Quadruplex–Strukturen
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	Stabilisierung von Sekundärstrukturen
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	Stabilisierung von Sekundärstrukturen
NaCl	150 mM	Minderung elektrostatischer Interaktionen
Tween 20	0,05 % (v/v)	Minderung hydrophober Interaktionen
BSA	1 µg·ml <sup>-1</sup>	Kompetitor für unspezifische Interaktionen
poly(dI-dC)	1 µg·ml <sup>-1</sup>	Kompetitor für unspezifische Interaktionen
pH	7,5	

### 3.1.2 Analytik von Aptamerkandidaten

Der Analytik kommt im SELEX–Prozess eine besondere Bedeutung zu. Sie dient zur Erhebung der Daten als Grundlage für die Optimierung der einzelnen SELEX–Teilschritte, sie wird im späteren Selektionsverlauf eingesetzt um den eingestellten Selektionsdruck zu überprüfen und den Erfolg der durchgeführten Arbeiten zu bestätigen. Die Analytik für einen SELEX–Prozess muss dabei verschiedenen Herausforderungen begegnen. So sind die erhaltenen Probenmengen sehr klein (meist im kleinen µl–Maßstab) und enthalten gleichzeitig nur geringe Konzentrationen an Probenmolekülen. Da die enthaltenen Stoffmengen entsprechend klein sind, müssen die Analyseverfahren außerordentlich sensitiv sein.

#### Überwachung der Stoffmenge mittels Real Time PCR

Zur Messung der Konzentration der Aptamerkandidaten wurde die Real Time PCR eingesetzt. Die Real Time PCR bedient sich dabei der zwei Primerbereiche, welche die zentrale totalrandomisierte Region eines jeden Aptamerkandidaten flankieren. Für die Messung wird der Reaktionsmischung ein Farbstoff zugesetzt, der sich unспе-

zifisch an DNA-Doppelstränge anlagert und nach dieser Anlagerung zur Fluoreszenz fähig ist.

Da die Zusammensetzung der Real Time PCR Mastermixe zwischen den verschiedenen Herstellern nicht identisch ist und oft der Geheimhaltung unterliegt, müssen die Reaktionsparameter für jeden ausgewählten Mastermix optimiert werden. Variationen bestehen neben der verwendeten Polymerase, des fluoreszenten Farbstoffes, eventuell verfügbaren *Hot-Start* Mechanismen, der Magnesiumkonzentration und der Art der Gegenionen oft in der Art und Menge von *PCR-Enhancern*. Die Reaktionsbedingungen wurden durch Variation der Reaktionsparameter wie beispielsweise der Annealingtemperatur, der zeitlichen Reaktionsführung und der eingesetzten Konzentration von Primern optimiert.

Wichtigster Reaktionsparameter ist die Annealingtemperatur und die zeitliche Führung des Temperaturprofils der Reaktion. Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur wurde diese während der Real Time PCR variiert. So kann in einer Gradienten Real Time PCR der Effekt der Annealingtemperatur durch Messung ansonsten identisch geführter Reaktionen nachvollzogen werden. Steigt der *quantification cycle*, bedeutet dies nicht-optimale Reaktionsbedingungen. Der *quantification cycle* ist dabei der Punkt, ab dem sich die Fluoreszenz einer Probe in der Real Time PCR signifikant vom Hintergrund abhebt und kann bei optimalen Reaktionsbedingungen als inverses Maß der Ausgangskonzentration an DNA in der Probe verstanden werden. Als Ausgangspunkt für den Gradienten wurde die in der Literatur angegebene Annealingtemperatur von 56 °C eingesetzt und um  $\pm 5$  °C variiert (vgl. Abb. 3.1.4) <sup>(81)</sup>.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

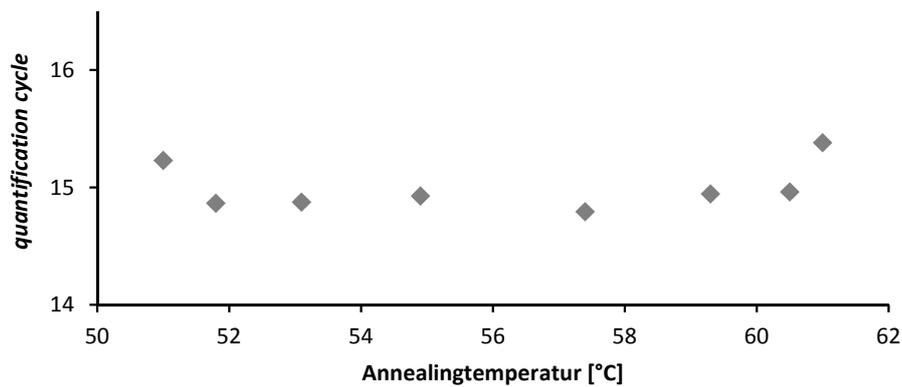


Abb. 3.1.4: Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur in der Real Time PCR

Die in der Literatur vorgeschlagene Annealingtemperatur von 56 °C wurde als Optimum bestätigt. Gleichzeitig wird auch eine Abweichung der Annealingtemperatur in einen Bereich von 52 °C – 60 °C scheinbar ohne große Anstiege im *quantification cycle* toleriert. Ein weiterer Reaktionsparameter ist die Primerkonzentration. Zur Optimierung wurde wiederum eine Real Time PCR durchgeführt, in der die Primerkonzentration variiert wurde (vgl. Abb. 3.1.5). Da die Real Time PCR sensitiv auf die Bildung von Primerdimeren reagiert, wurde Wasser als Negativkontrolle oder *No Template Control* (NTC) eingesetzt.

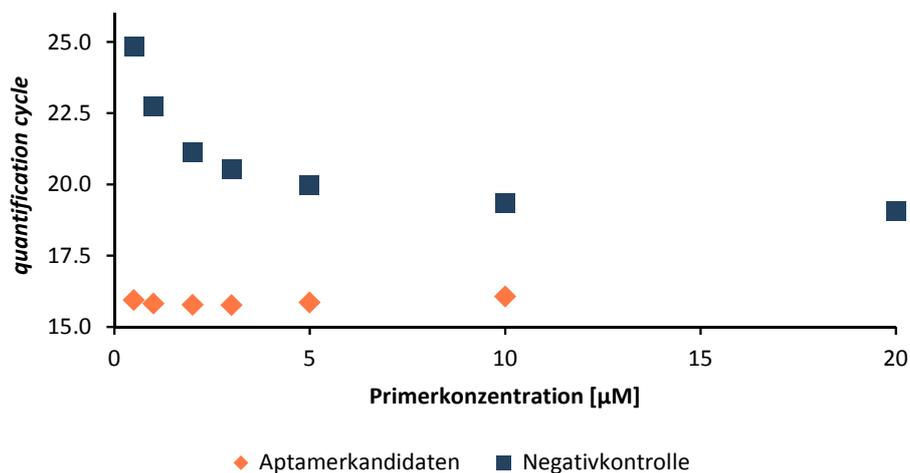


Abb. 3.1.5: Bestimmung der optimalen Primerkonzentration in der Real Time PCR im Vergleich zur Negativkontrolle

Eine Änderung der Primerkonzentration zeigt kaum einen Effekt auf Proben mit Bibliothek von Aptamerkandidaten, dies deutet auf eine hohe Robustheit hin. Im Gegensatz dazu sinkt der *quantification cycle* der Negativkontrollen ohne Template mit steigender Primerkonzentration erheblich. Dies bedeutet eine zunehmende Entstehung von unerwünschten Primerdimeren bei hohen Primerkonzentrationen. Signale von Primerdimeren können die Signale der Aptamerkandidaten verfälschen oder schlimmstenfalls überlagern. Daher wurden alle nachfolgenden Messungen in der Real Time PCR mit einer Primerkonzentration von  $0,4 \mu\text{M}$  durchgeführt, bei der die Bildung von Primerdimeren am geringsten ist.

### Referenzsubstanzen für die Real Time PCR

Eine absolute Quantifizierung erfolgt in der Real Time PCR immer in Relation zu Standards mit bekannter Konzentration. Diese müssen für eine akkurate Quantifizierung stets mitgeführt werden, um die Vielzahl der beeinflussenden Faktoren zu berücksichtigen. Dabei ist die Auswahl einer Referenzsubstanzen für den SELEX-Prozess schwierig, da sich die Komplexität und Zusammensetzung der Probe im Verlauf der Selektion ändert.

So beginnt dieser SELEX-Prozess mit etwa 600 Billionen unterschiedlichen Aptamerkandidaten (etwa  $6,0 \cdot 10^{14}$  individuelle Sequenzen), von denen jeweils nur ein Exemplar vorliegt. Eine Probe aus diesem Stadium des SELEX-Prozess ist definiert als eine Untergruppe der Startmenge und enthält ausschließlich ein Exemplar des jeweiligen Aptamerkandidaten, ist also hoch komplex. In der Selektion bindet nur ein kleiner Anteil an das Zielmolekül und wird so nach den Waschschritten in der PCR vervielfältigt. Ab diesem Punkt besteht die Population der Aptamerkandidaten aus einer Anzahl von Klonen der ursprünglichen Aptamerkandidaten, die Komplexität der Probe ist gesunken. So verändert sich die Komplexität und Zusammensetzung einer Probe im Verlauf des SELEX stetig.

Ähnlich wie in einer „konventionellen“ PCR erzeugt die hohe Komplexität der Proben und die partielle Sequenzhomologie der Aptamerkandidaten in der Real Time PCR eine Reihe von Problemen, gerade zu Beginn des SELEX-Prozesses (siehe: *Probleme durch Diversität* auf S. 21). Die auftretenden Effekte müssen auch für die Referenzsubstanzen der Real Time PCR berücksichtigt werden, damit eine akkurate Quantifizierung erfolgen kann.

Als Referenzsubstanz kommen also naturgemäß entweder komplexe Mischungen der möglichen Aptamerkandidaten, Gemische aus mehreren Einzelsequenzen, in späteren Selektionszyklen auch Einzelsequenzen in Betracht. Für den Modellprozess wurden daher sowohl eine komplexe Referenzsubstanz als auch eine Einzelsequenz getestet. Als komplexe Referenzsubstanz wurde die Startbibliothek der Aptamerkandidaten eingesetzt, die damit die maximale Komplexität aufweist, mit der die Real Time PCR konfrontiert wird. Im Gegensatz dazu steht eine Einzelsequenz für die minimale Komplexität einer Probe aus dem SELEX-Prozess. Die Einzelsequenz soll dabei keine Sekundärstrukturen ausbilden und mit den gleichen Primern amplifiziert werden können wie die Aptamerkandidaten. Für die Konstruktion dieser Einzelsequenz wurde daher eine Kern-Sequenz mit einem GC-Gehalt von 50 % zufällig generiert und mit den Primerbindestellen der SELEX flankiert. In bioinformatische Analysen konnte die Abwesenheit von stabilen Sekundärstrukturen innerhalb der Gesamtsequenz bestätigt werden (mfold<sup>(92)</sup>, jPCR<sup>(93)</sup> und IDT's Oligo Analyzer<sup>(94)</sup>). Zusätzlich kann eine Dimerisierung der Einzelsequenz mit sich selbst oder den Primern unter PCR Bedingungen ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des dynamischen Bereichs der Real Time PCR wurden dekadische Verdünnungsreihen der jeweiligen Referenzsubstanzen eingesetzt (vgl. Abb. 3.1.6).

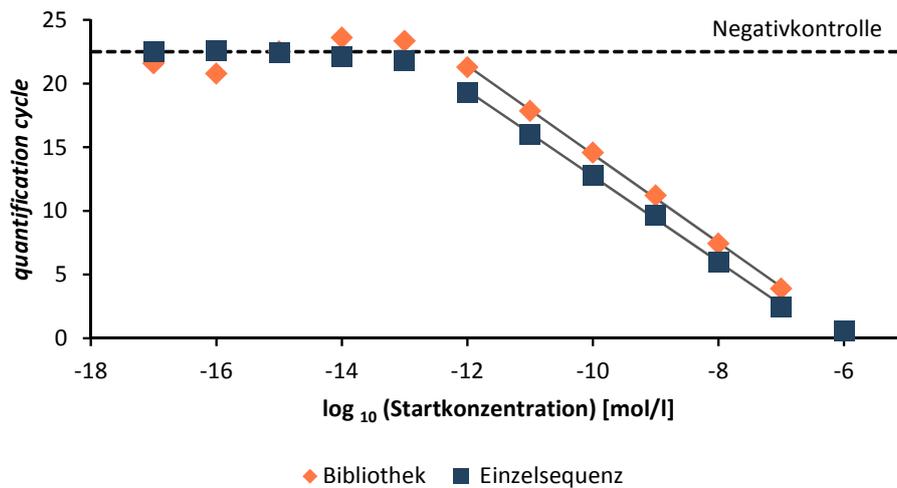


Abb. 3.1.6: Bestimmung des dynamischen Bereichs in der Real Time PCR für Standardsubstanzen mit hoher und minimaler Komplexität (Bibliothek vs. Einzelsequenz); Wasser als Negativkontrolle

Obwohl beide Referenzsubstanzen jeweils in der selben Konzentration eingesetzt wurden, sind die gemessenen *quantification cycle* nicht gleich, sondern die Einzelsequenz weist stets einen kleineren *quantification cycle* auf. Dies sind jedoch keine Unterschiede in der Amplifikation, da die Differenz zwischen Bibliothek und Einzelsequenz nahezu konstant ist. Stattdessen beruht diese Differenz vermutlich auf einem leichten Konzentrationsunterschied der Stammlösungen, aus denen die Verdünnungsreihen erstellt wurden, und verdeutlicht damit die Abhängigkeit der Real Time PCR von den mitgeführten Standards. Beide Referenzsubstanzen zeigen einen linearen dynamischen Bereich zwischen  $10^{-12}$  M und  $10^{-7}$  M (1 pM – 100 nM). Bei Konzentrationen unterhalb von 1 pM kann nicht mehr sicher vom Hintergrundsignal (Negativkontrolle) unterscheiden werden. Die Standardkurven wiesen ein hohes Bestimmtheitsmaß auf ( $r^2 > 0,99$ ). Innerhalb des linearen Bereiches liegt die PCR Effizienz nahe 100 %, was optimale Reaktionsbedingungen anzeigt. Unabhängig davon zeigen die Schmelzkurven der Referenzsubstanzen deutliche Unterschiede (vgl. Abb. 3.1.7).

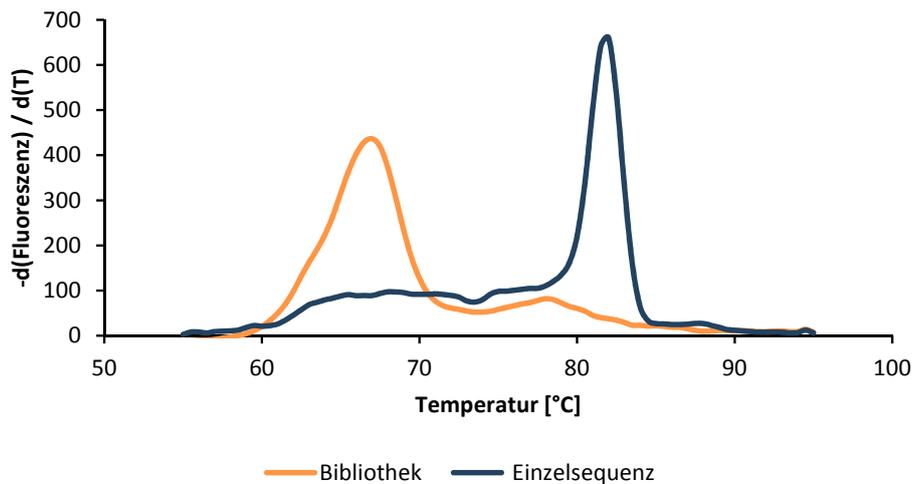


Abb. 3.1.7: Schmelzkurven der Referenzsubstanzen mit hoher und minimaler Komplexität in der Real Time PCR (Bibliothek vs. Einzelsequenz)

Das PCR-Produkt der Reinsubstanz schmilzt in einem eng begrenzten Temperaturbereich um  $82\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ . Im Gegensatz dazu schmilzt das PCR-Produkt der Bibliothek in einem breiten Schmelzbereich von  $60\text{ °C} - 70\text{ °C}$ . Obwohl die Bibliothek und die Einzelsequenz die gleiche Länge und denselben *mittleren* GC-Gehalt aufweisen, ist der GC-Gehalt der Aptamerkandidaten in der Bibliothek normalverteilt. Entsprechend ist der Schmelzbereich der Bibliothek wegen des schwankenden GC-Gehalts breiter. Gleichzeitig führt die hohe Komplexität der Bibliothek zur Bildung von Heteroduplexen mit partiellen Fehlhybridisierungen, deren Schmelztemperatur entsprechend niedriger ist. Dieser Zusammenhang wurde im Folgenden weiter untersucht.

### Diversitätsstandards für die Real Time PCR

Ausgehend davon, dass die Verschiebung der Schmelzbereiche reproduzierbar auftrat wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Größe der Verschiebung und der Komplexität in der Probe untersucht. Dazu wurden auf Basis der Referenz-Einzelsequenz eine Reihe von degenerierten Varianten geschaffen, in denen innerhalb der zentralen Region in gleich verteilten Abständen das jeweilige Nukleotide randomisiert wurde (äquivalent zum Distro-Prinzip<sup>(70)</sup>). Durch Erhöhung der An-

## Experimente zur Selektion von Aptameren

zahl an randomisierten Nukleotiden steigt dabei die Komplexität an. Ausgehend von der Einzelsequenz wurden so Varianten mit 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 randomisierten Positionen erzeugt (vgl. Abb. 3.1.8).

Name	Anzahl Varianten	Sequenz
0 N	1	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
2 N	16	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
4 N	256	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
6 N	4.096	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
8 N	65.536	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
10 N	1.048.576	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
12 N	16.777.216	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT
14 N	268.435.456	GGTATTGAGGGTCGCATCCAAGATCTGTATAGATTTTCGCACGCCAGTTGGATGGCCGATGGCTCTAACTCTCCTCT

Primerbereich
Primerbereich

Abb. 3.1.8: Diversitätsstandards für die Real Time PCR

Aus diesen Diversitätsstandards (0 N – 14 N) wurden dann in einer kurzen PCR (4 Zyklen) doppelsträngiges Material generiert, das nach seiner Hybridisierung wieder geschmolzen wurde (vgl. Abb. 3.1.9).

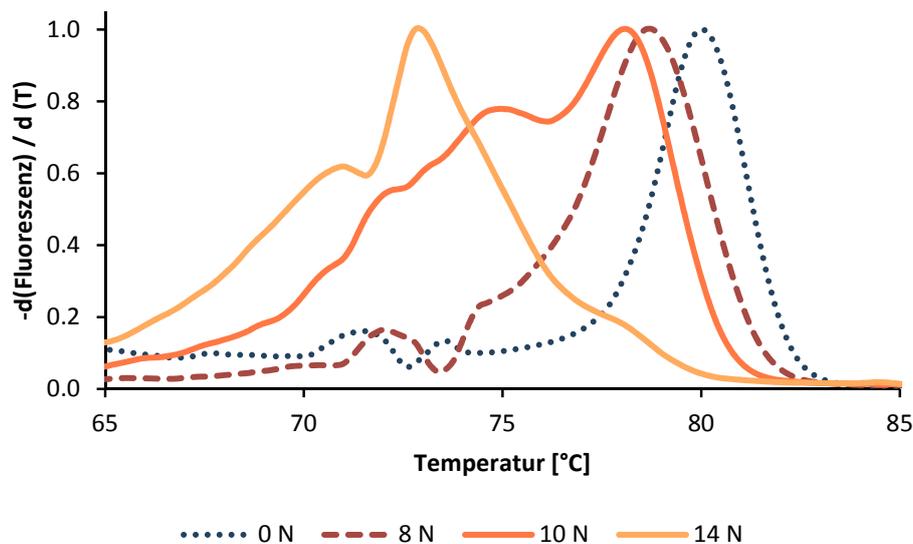


Abb. 3.1.9: Normierte Schmelzkurven der Diversitätsstandards unterschiedlicher Komplexität (0 bis 14 randomisierte Positionen)

Wiederum zeigt die Reinsubstanz (0 N) einen schmalen, wohldefinierten Schmelzbereich bei 80°C. Das Material mit acht randomisierten Positionen (8 N) zeigt dagegen bereits einen Drift zu einer niedrigeren Schmelztemperatur, sowie kleine Mengen an Produkt, die mit 72°C und 75°C einen wesentlich niedrigeren

Schmelzpunkt aufweisen. Der Trend des Temperaturdrifts setzt sich für die Proben mit zusätzlichen randomisierten Positionen weiter fort, während gleichzeitig der Anteil an Produkten mit niedrigen Schmelzpunkt rapide zunimmt. Dies bestätigt die Theorie, dass partielle Fehlhybridisierungen der Heteroduplexe für die Verschiebung der Schmelztemperatur der PCR-Produkte von Aptamerkandidaten ursächlich sind. Gleichzeitig kann die Größe der Verschiebung des Schmelzpunktes der Probe von Aptamerkandidaten herangezogen werden, um die Komplexität in der Probe zu beurteilen. Unterschiede in der Komplexität der Probe wirken sich dabei jedoch nicht auf die Richtigkeit der Quantifizierung aus, sodass sowohl komplexe Referenzsubstanzen als auch Einzelsequenzen als Standard für die Real Time PCR dienen können. Die Real Time PCR wurde somit erfolgreich für den Einsatz in der SELEX optimiert und kann daher sowohl für die Quantifizierung der Aptamerkandidaten als auch zur Bestimmung der Komplexität der Bibliothek eingesetzt werden.

### **Real Time PCR für das Aptamer 6H7**

Bevor die SELEX als Ganzes getestet wird, soll der Selektionsschritt dieses SELEX-Modellprozesses vorab mit einem bereits selektiertem Aptamer (6H7; gegen His-Tag) getestet werden. Dabei soll das 6H7-Aptamer während des simulierten Selektionsschrittes mit anderen Aptamerkandidaten in Konkurrenz stehen. Daher muss die Real Time PCR ebenfalls in der Lage sein, auch in der Gegenwart von Aptamerkandidaten mit den selben Primerbindestellen spezifisch das 6H7-Aptamer zu detektieren.

Zu diesem Zweck wurde die bisher verwendete Real Time PCR modifiziert. Von der ursprünglich optimierten Real Time PCR wurden die Primer und Reaktionsbedingungen übernommen. Statt dem sequenzunabhängigen Fluoreszenzfarbstoff wurde jedoch eine 6H7-spezifische Hydrolysesonde eingesetzt (vgl. Abb. 3.1.10)<sup>1</sup>. Die Hydrolysesonde besteht dabei aus einem kurzen DNA-Einzelstrang, der am

---

<sup>1</sup> siehe Masterarbeit von Roman Hilje "Automation of an *in vitro* selection process" (2015)

## Experimente zur Selektion von Aptameren

5' Ende mit Fluorescein, in der Mitte mit dem ZEN Quencher und am 3' Ende mit dem Iowa Black Fluorescent Quencher funktionalisiert ist. Der interne Quencher senkt dabei das Hintergrundsignal der Real Time PCR und ermöglicht so eine bessere Sensitivität. Die Sequenz der Hydrolysesonde wurde dabei aus dem zentralen Bereich des 6H7-Aptamers abgeleitet (Programm: PrimerQuest Tool von IDT <sup>(95)</sup>). Aufgrund ihrer Sequenz lagert sich die Hydrolysesonde während des *Annealings* lediglich an das 6H7-Aptamer an und wird dann während der Elongation von der Polymerase durch deren 5'-3' Exonuclease-Aktivität abgebaut. Durch die räumliche Trennung infolge der Hydrolyse der Sonde wird der fluoreszierende Farbstoff nicht länger vom Quencher inhibiert, die Fluoreszenz ist dann proportional zu der Menge an hydrolysierten Sonden. So kann durch den Einsatz einer Hydrolysesonde die Häufigkeit eines bestimmten Sequenzmotives auch innerhalb der komplexen Mischung von Aptamerkandidaten bestimmt werden. Wiederum kann die initiale Menge in einer Probe anhand von Standards mit bekannter Konzentration an 6H7-Aptamer ermittelt werden.

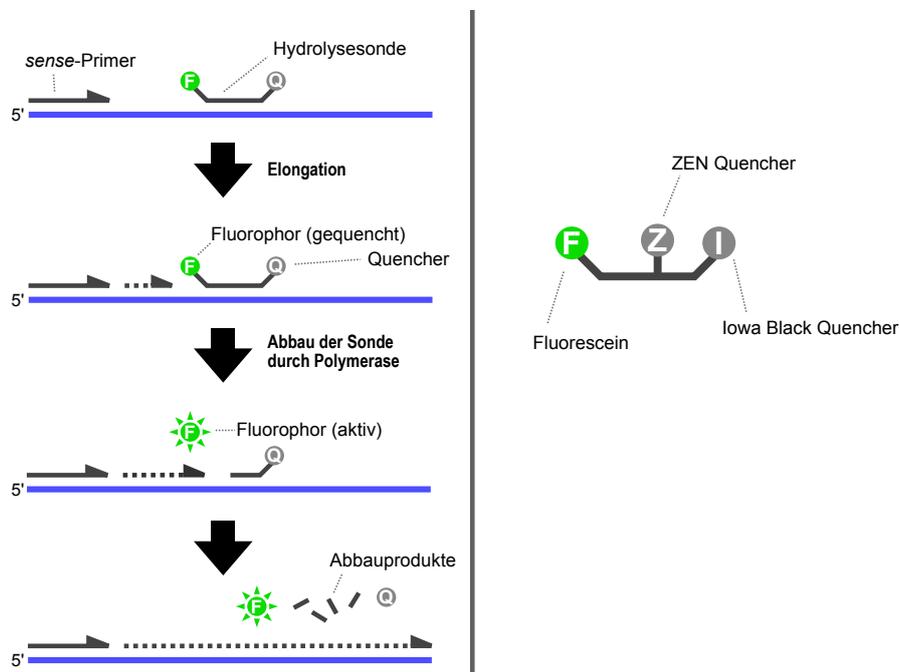


Abb. 3.1.10: Funktionsprinzip der Real Time PCR mit Hydrolysesonde und Aufbau der 6H7-Hydrolysesonde mit zusätzlichem internen Quencher für vermindertes Hintergrundsignal

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Da die Real Time PCR auf Basis einer Hydrolysesonde auf eine bereits optimierte Real Time PCR aufgebaut wurde, wurden die PCR-Parameter nicht neu optimiert. Stattdessen wurde überprüft, ob die zuvor als optimal gefundenen PCR-Bedingungen auch auf das Assay mit Hydrolysesonde übertragen werden können (vgl. Abb. 3.1.11). Dazu wurde eine serielle Verdünnungsreihe eingesetzt, anhand der die PCR-Effizienz ermittelt werden kann.

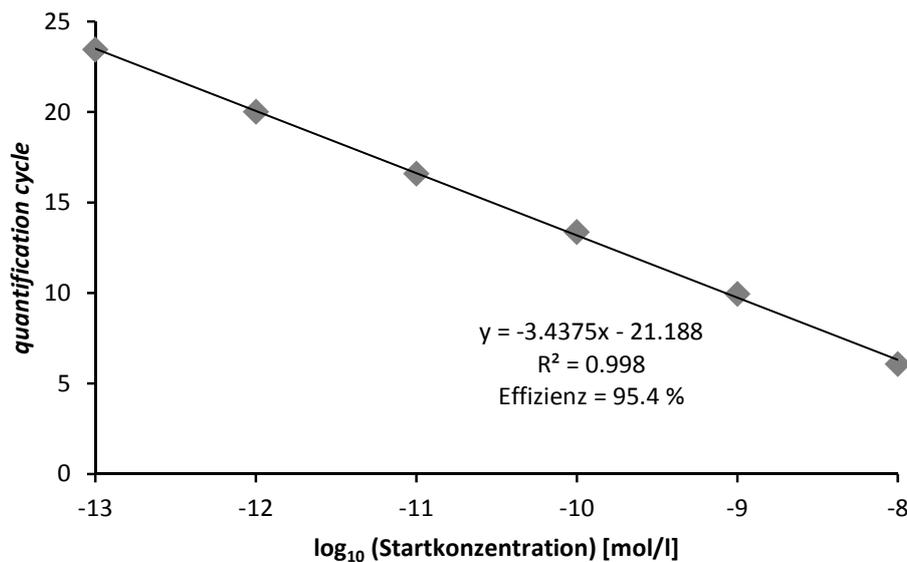


Abb. 3.1.11: Effizienzbestimmung der Real Time PCR mit 6H7-Hydrolysesonde

Dabei erreicht die Real Time PCR mit den SELEX-Primern und der Hydrolysesonde eine Effizienz von 95,4% und kann daher ohne weitere Modifikationen für Quantifizierungen im Bereich von 10 nM bis 100 fM eingesetzt werden.

Da die Real Time PCR die Menge an 6H7-Aptamer auch in Gegenwart von anderen Aptamerkandidaten erfassen soll, muss im nächsten Schritt der Einfluss von zugesetzten Aptamerkandidaten auf die 6H7-Quantifizierung bestimmt werden. Dazu wurde eine Mischreihe von 6H7-Aptamer und Bibliothek eingesetzt, wobei jede Probe eine gleichbleibende Gesamtkonzentration an Bibliothek und 6H7-Aptamer von insgesamt 1  $\mu\text{M}$  enthält. Variiert wurde lediglich der Anteil des 6H7-Aptamers an der Gesamtkonzentration (vgl. Abb. 3.1.12). Die Proben mussten vor der Messung jeweils 1 zu 1000 verdünnt werden, damit diese in der Real Time PCR vermessen werden konnten.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Für die Bestimmung des Anteils von 6H7 in einer Probe wurden jeweils zwei separate Real Time PCR durchgeführt. In einer Real Time PCR mit 6H7–Hydrolysesonde wurde die Konzentration an 6H7–Aptamer in der Probe ermittelt. In einer weiteren Real Time PCR wurde die Gesamtkonzentration der Bibliothek und des 6H7–Aptamers durch Verwendung eines sequenzunabhängigen Fluoreszenzfarbstoffs gemessen (siehe: *Überwachung der Stoffmenge mittels Real Time PCR* auf S. 39). Aus diesen beiden Konzentrationen wurde anschließend der Anteil des 6H7–Aptamers im Gemisch berechnet.

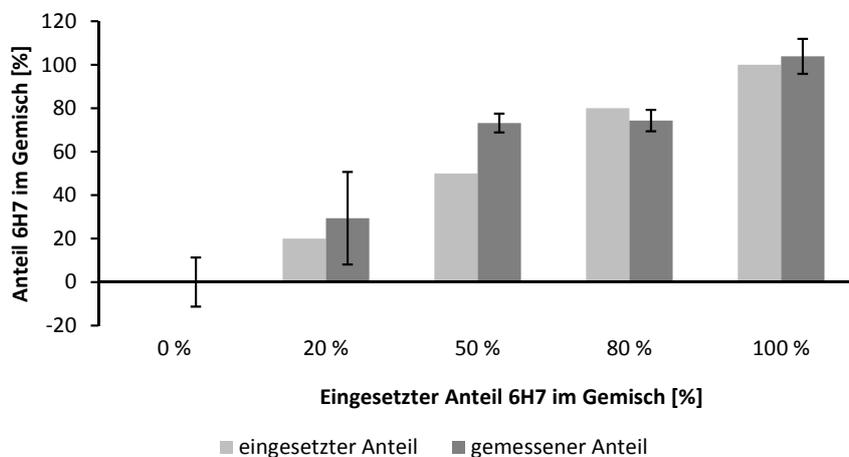


Abb. 3.1.12: Evaluierung der Real Time PCR zur Detektion des 6H7–Aptamers im Gemisch mit Aptamerkandidaten

Durch Vergleich des eingesetzten Anteils und des gemessenen Anteils kann der Einfluss des Anteils an Bibliothek in der Probe auf die Bestimmung des Anteils von 6H7 ermittelt werden. Dabei entsprechen die ermittelten Anteile des 6H7–Aptamers weitgehend den eingesetzten Anteilen. Lediglich für 50 % Anteil im Gemisch weicht das Ergebnis etwas ab. Diese Ungenauigkeiten sind jedoch für Ergebnisse akzeptabel, die aus zwei unabhängigen Real Time PCR Messungen berechnet wurden.

Die Real Time PCR mit Hydrolysesonde ist also eine geeignete Methode zur Erfassung der Konzentration des 6H7–Aptamers und dessen Anteils im Gemisch. Insgesamt ist die Real Time PCR in ihren Variationen ein wertvolles Werkzeug zur Überwachung der Stoffmengen im SELEX–Prozess.

### Alternative Verfahren zur Quantifizierung einzelsträngiger Aptamerkandidaten

In Konzentrationsbereichen über 10 nM kann die Real Time PCR nicht für die Quantifizierung verwendet werden, da dies nicht mehr im linearen dynamischen Bereich der Real Time PCR liegt. Durch Verdünnen der Proben könnte zwar ein messbarer Bereich erreicht werden, jedoch sind Real Time PCR Messungen mit ca. 4 h zeitintensiv und zusätzlich kostenintensiv, da für jede Messung entsprechende Standards und Kontrollreaktionen mitgeführt werden müssen. Alternativ zur Real Time PCR wurden zur Quantifizierung in hohen Konzentrationsbereichen daher einzel- oder doppelstrangaffine Farbstoffe eingesetzt, die nach Anlagerung an die DNA zur Fluoreszenz fähig sind (z. B. Quant-iT OliGreen ssDNA reagent). In Kombination mit einem Nanodrop ND-3300 Fluorospektrometer lag die messbare Konzentration zwischen 1 nM und 1  $\mu$ M.

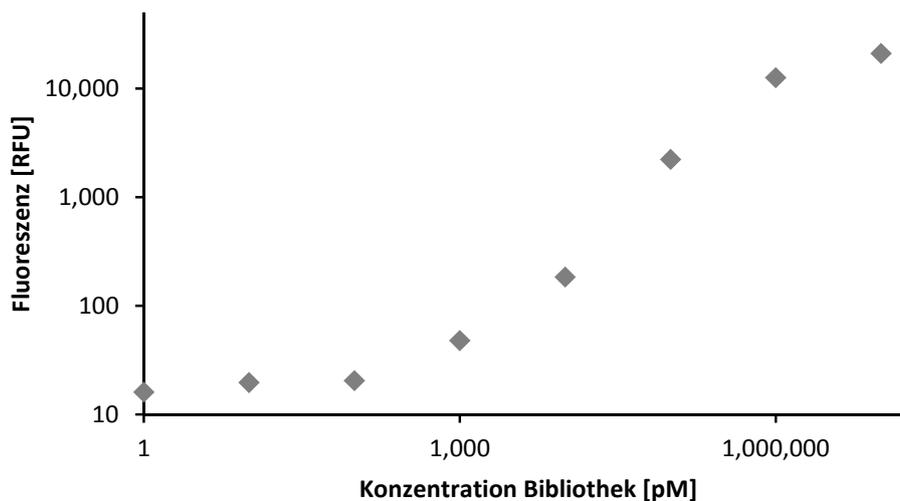


Abb. 3.1.13: Exemplarische Standardkurve für die Quantifizierung einer Bibliothek mit Quant-iT OliGreen ssDNA reagent

### Länge und Hybridisierungsstatus von Aptamerkandidaten

Neben der Quantifizierung müssen auch die Länge und der Hybridisierungsstatus der Aptamerkandidaten ermittelt werden können. Eventuelle Längenänderungen von Aptamerkandidaten wurden in denaturierenden Agarose- oder Polyacrylamid-

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Gelelektrophoresen untersucht<sup>2</sup>. Dabei sind Polyacrylamid–Gele aufgrund ihrer geringeren Schichtdicke und entsprechend geringerem Hintergrundsignal gegenüber Agarose–Gelen zu bevorzugen. Durch den Zusatz von 7 M Harnstoff zum Polyacrylamid–Gel werden dabei die intra– und intermolekularen Hybridisierungen der Aptamerkandidaten unterdrückt, sodass diese linear und einzelsträngig vorliegen. Für die Färbung von Polyacrylamid–Gelen steht neben den klassischen Farbstoffen für die Färbung von Agarose–Gelen (SYBR GREEN I + II und nicht–mutagene Substitute), auch die Silberfärbungen zur Verfügung. In diesem Zusammenhang wurden in der Bachelorarbeit von Zawadi Hellmann verschiedene Färbemethoden für Polyacrylamid–Gele evaluiert (vgl. Tab. 3.1.4).

Tab. 3.1.4: Vergleich verschiedener Färbemethoden für DNA in Polyacrylamid–Gelen

<b>Methode</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Zeitaufwand</b>	<b>Schärfe der Banden</b>
RotiSafe GelStain	200 pg	ca. 30 min	mittel
SYBR Green II	100 pg	ca. 30 min	scharf
Silberfärbung	> 1 pg	ca. 1,5 h	sehr scharf

Zusammenfassend liefern fluoreszierende Farbstoffe dabei gute Ergebnisse, gerade bei geringen Analyt–Mengen ist jedoch die Silberfärbung aufgrund ihrer höheren Sensitivität überlegen. Neben der Analyse der Fragmentlänge können Gelelektrophoresen auch zur Analyse des Hybridisierungsstatus genutzt werden. So hat auch die Konformation der DNA einen Einfluss auf deren elektrophoretische Mobilität. Dabei ist beispielsweise die elektrophoretische Mobilität für Heteroduplexe im Gegensatz zu Homoduplexen erniedrigt<sup>(82)</sup>. Zusätzlichen Einfluss haben zudem Sekundärstrukturen, die ebenfalls zu einer Erniedrigung der elektrophoretischen Mobilität führen. Auch doppelsträngige DNA wandert im nativen Gel aufgrund ihrer kleineren Flexibilität im Gegensatz zur einzelsträngigen DNA nicht

---

<sup>2</sup> siehe Bachelorarbeit von Zawadi Hellmann "Analyse von Technologien zur Erzeugung von DNA-Einzelsträngen aus PCR-Produkten" (2014)

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

so weit <sup>(52)</sup>. In der SELEX ist dies insbesondere für die Bewertung produzierter Aptamerkandidaten wichtig. Zur Verdeutlichung wurden eine Bibliothek aus Aptamerkandidaten und eine einzelne Sequenz amplifiziert und deren PCR-Produkte einer Strangtrennung unterzogen (siehe: *Gewinnung einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus PCR-Produkten* auf S. 63). Die Aptamerkandidaten und die einzelne Sequenz sind dabei jeweils 78 nt lang. Die erhaltenen PCR-Produkte, die Einzelstränge sowie ein synthetischer Einzelstrang wurden anschließend in einer PAGE mit Silberfärbung untersucht (vgl. Abb. 3.1.14).

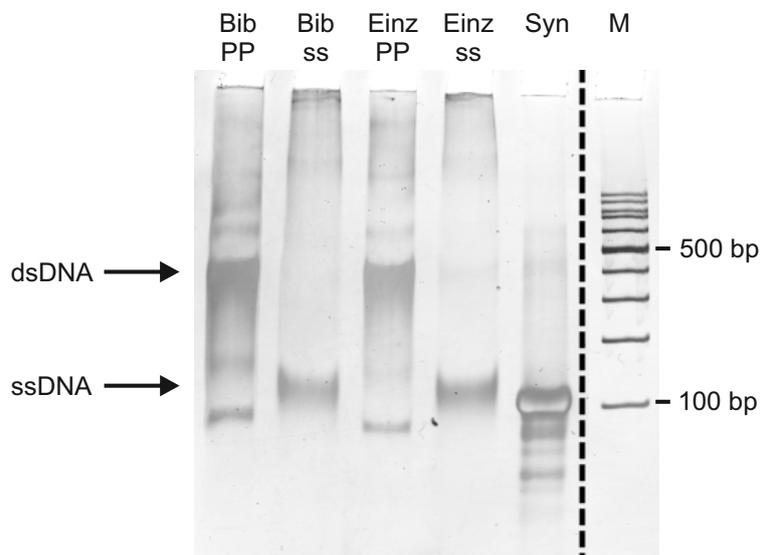


Abb. 3.1.14: Erzeugte DNA-Einzelstränge (ss) im Vergleich zum PCR-Produkt (PP); Proben aus einer Bibliothek mit hoher Komplexität (Bib) im Vergleich zu Proben einer einzelnen Sequenz (Einz). Synthetischer Einzelstrang (Syn) zum Vergleich. M = Marker (M; 100 bp DNA Marker). PAGE; Silberfärbung

Die stärkste Bande in den Proben der PCR-Produkte liegt bei etwa 400 bp. Beide Proben weisen zudem eine Bande bei < 100 bp auf. Für die erzeugten Einzelstränge ist dagegen nur Bande bei > 100 bp sichtbar, diese Bande findet sich auch bei dem synthetischen Einzelstrang wieder. Die Probe des synthetischen Einzelstrangs zeigt zudem zusätzliche Banden geringerer Größe, wobei es sich hier vermutlich um unvollständig synthetisierte Einzelstränge handelt. Aus dem gemeinsamen Laufverhalten der erzeugten Einzelstränge und des synthetischen Einzelstrangs kann zunächst geschlossen werden, dass die Strangtrennung erfolgreich

war. Gleichzeitig verdeutlicht diese Analyse die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität zwischen dsDNA und ssDNA.

### 3.1.3 Aufstellen eines minimalen SELEX-Prozesses

In diesem Modellprozess sollen alle Schritte einer *de novo* Selektion von Aptameren getestet und optimiert werden. Als Zielmoleküle dienen His-Tag-Proteine, die auf Magnetpartikeln immobilisiert sind. Nach der Bereitstellung der immobilisierten Zielmoleküle und der Bibliothek aus Aptamerkandidaten müssen nun die Methoden innerhalb der Selektionsrunden aufeinander abgestimmt werden.

Der erste Schritt jeder Selektionsrunde ist die Konditionierung der Aptamerkandidaten und der Zielmoleküle in Selektionspuffer. Anschließend folgt die Inkubation der Aptamerkandidaten mit den Zielmolekülen und die Abtrennung ungebundener Aptamerkandidaten in mehreren Waschschritten. Die verbliebenen gebundenen Aptamerkandidaten werden durch den Einsatz von Hitze denaturiert und so aus ihren Target-Komplexen freigesetzt. In der anschließenden PCR werden die so erhaltenen Aptamerkandidaten amplifiziert. Dabei wird ein biotinylierter *antisense*-Primer eingesetzt, der nach der PCR zur Strangtrennung der unmodifizierten Aptamerkandidaten von ihrem biotinyliertem *antisense*-Strang dient. Nach einer Konditionierung in Bindepuffer falten sich die einzelsträngigen Aptamerkandidaten in ihre dreidimensionale Struktur und gehen in die nächste Selektionsrunde ein (vgl. Abb. 3.1.15).

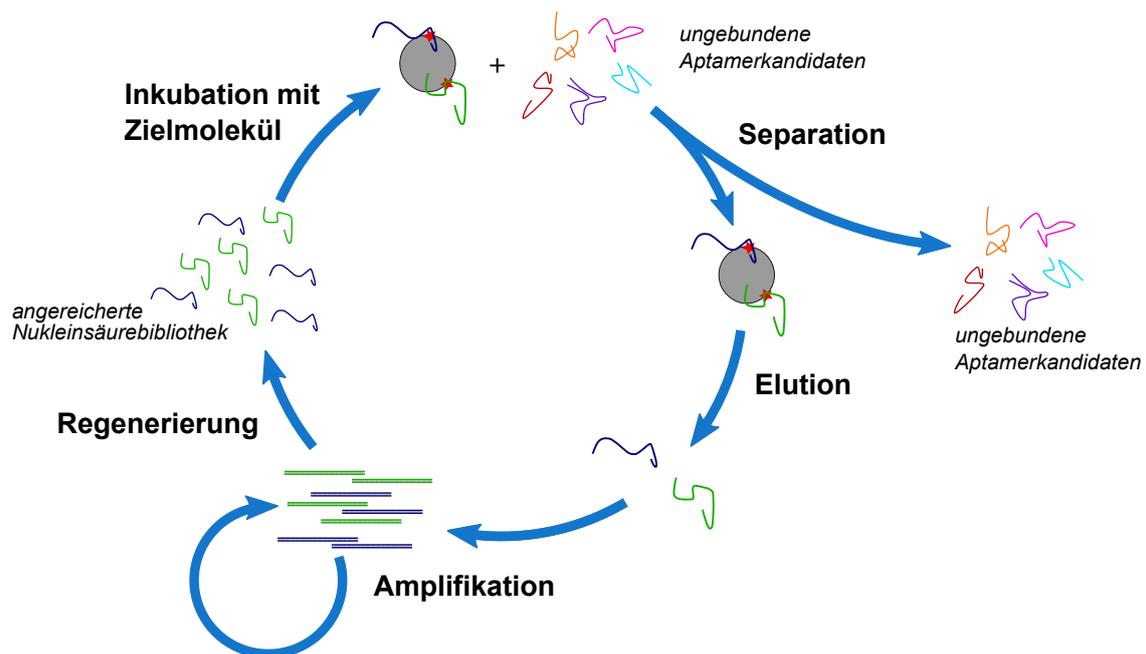


Abb. 3.1.15: Schematische Übersicht über eine Selektionsrunde innerhalb einer SELEX

### Konditionierung für die Selektion

Vor Beginn einer Selektionsrunde müssen die Zielmoleküle von ihrem Lagerungspuffer in das Puffersystem der Selektion überführt werden. Der Transfer in ein anderes Puffersystem ist in diesem Modellprozess relativ einfach, da die Zielmoleküle bereits auf Magnetpartikeln immobilisiert sind. So können die Magnetpartikel wiederholt mit Selektionspuffer gewaschen werden. Die kovalente Immobilisierung verhindert dabei ein Abwaschen oder Freisetzen der Zielmoleküle.

Zusätzlich müssen die Aptamerkandidaten konditioniert werden, um ihre korrekte Faltung einzunehmen. Die erhaltenen Aptamerkandidaten werden dazu kurz im Selektionspuffer hitzedenaturiert. Die Renaturierung in der chemischen Umgebung des Selektionspuffers erlaubt den Aptamerkandidaten die Ausbildung ihrer spezifischen dreidimensionalen Faltung.

### Inkubation mit Zielmolekülen und Trennverfahren in der SELEX

Die Inkubation der Zielmoleküle mit den Aptamerkandidaten ist der erste zentrale Schritt einer jeden Selektionsrunde. Hier findet die eigentliche Selektion der Aptamer-

merkandidaten statt. Für den Modellprozess soll zunächst ein Selektionsschritt simuliert werden, um die prinzipielle Funktionsfähigkeit und die Effektivität der angewandten Analytik zu überprüfen<sup>1</sup>.

Als Modell für eine reale Selektion wird das bereits selektierte Aptamer 6H7<sup>(77)</sup> zusammen mit anderen Aptamerkandidaten in einer Selektion gegen den His-Tag eingesetzt. Dazu wurde das Aptamer 6H7 zunächst mit der gleichen Menge nicht selektierter Aptamerkandidaten (Bibliothek) versetzt (je 100 pmol). Da das Aptamer 6H7 eine deutliche größere Affinität zu dem immobilisierten His-Tag aufweist als die Bibliothek, müsste das 6H7-Aptamer während der Selektion die Aptamerkandidaten verdrängen, sodass nach Ende des Selektionsschrittes nur 6H7-Aptamer in der Elutionsfraktion verbleibt.

Die simulierte Selektion beginnt mit der Inkubation des Gemisches aus 6H7-Aptameren und unselektierter Bibliothek mit dem immobilisierten Zielprotein (BSTE-His) für 60 Minuten. Als Negativkontrolle wurden leere und oberflächeninaktive Magnetpartikel eingesetzt, für die keine Anreicherung des 6H7-Aptamers erwartet wird. Ähnlich zu einer echten Selektion wurden ungebundene Aptamere / Aptamerkandidaten nach Ablauf der Inkubationszeit durch zwei kurze Waschschrte aus der Selektion entfernt. Die Elution der gebundenen Aptamere erfolgt hier kompetitiv mit Imidazol über den Zeitraum von 60 Minuten. Die erhaltenen Waschfraktionen und die Elutionsfraktion wurden abschließend mit der Real Time PCR auf ihren Gehalt an 6H7-Aptamer und verbleibenden anderen Aptamerkandidaten untersucht (vgl. Abb. 3.1.16).

---

<sup>1</sup> siehe Masterarbeit von Roman Hilje "Automation of an *in vitro* selection process" (2015)

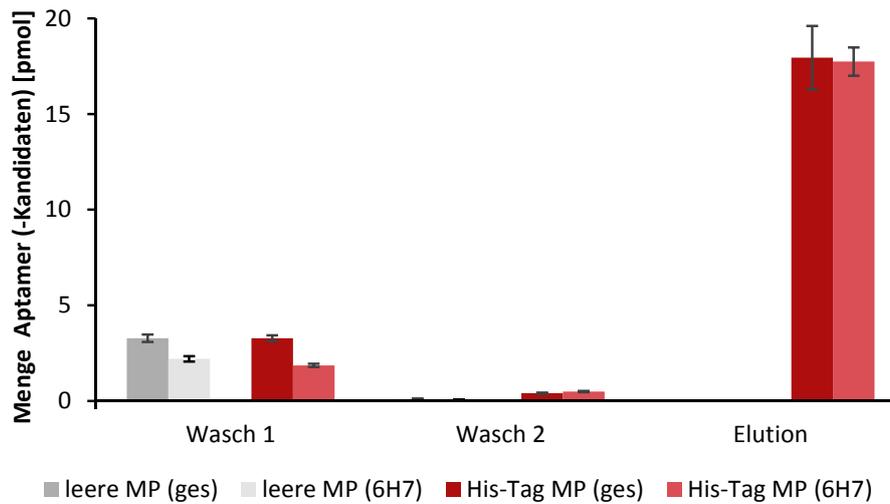


Abb. 3.1.16: Simulierte Selektion des 6H7-Aptamers in Konkurrenz zu unselektierten Aptamerkandidaten. Selektion gegen His-Tag-Proteine oder gegen leere Magnetpartikel (Negativkontrolle); jeweils Gesamtmenge (ges) und Menge an 6H7 (6H7)

Die Waschfraktion 1 der Magnetpartikel enthält sowohl in der Negativkontrolle wie auch für die Target-Magnetpartikel etwa die gleiche Menge an Aptameren und Aptamerkandidaten. Für die Magnetpartikel mit Zielmolekül entfallen dabei etwa 50 % auf das 6H7-Aptamer und etwa 50 % auf die unspezifischen Kompetitoren. Dieses Verhältnis ist mit dem Verhältnis vor der Inkubation identisch und zeigt, dass im Totvolumen der Magnetpartikel Aptamere und Aptamerkandidaten verbleiben.

Erwartungsgemäß enthält die Waschfraktion 2 für die Negativkontrolle deutlich weniger Aptamere oder unspezifische Aptamerkandidaten. Die Waschfraktion der Magnetpartikel mit Zielmolekül enthält hier eine leicht größere Gesamtmenge, die nahezu vollständig aus 6H7-Aptamer besteht. Da die Menge im Vergleich zur Negativkontrolle größer ist und vollständig aus dem 6H7-Aptamer besteht, deutet dies darauf hin, dass sich bereits gebundenes 6H7-Aptamer wieder aus seinem Komplex mit dem Zielmolekül löst. In einer „echten“ Selektion würde hier der Selektionsdruck auf der Komplexdissoziationskonstante ( $k_{\text{off}}$ ) liegen.

In der Elutionsfraktion der Magnetpartikel mit Zielmolekül finden sich eine vergleichsweise große Menge an 6H7-Aptameren ohne nennenswerte Verunreinigung durch Aptamerkandidaten wieder. Dies bestätigt, dass das 6H7-Aptamer zunächst an sein Zielmolekül gebunden hat, während der Waschschrte in seinem Komplex verblieben ist und dann gezielt eluiert wurde. Der Anteil an unspezifischen Aptamerkandidaten nimmt dabei im Verlauf der Waschschrte stetig ab, sodass lediglich „echte“ Aptamere eluiert werden.

Die simulierte Selektion ist also erfolgreich, in künftigen Selektionen sollte jedoch die Anzahl der Waschschrte und das Waschvolumen erhöht werden um bessere Aptamere zu erhalten (bezüglich  $k_{\text{off}}$ ). Gleichzeitig zeigen die Aptamerkandidaten keine ausgeprägte Bindung an die Hintergrundmatrix der Magnetpartikel (Negativkontrolle). Die Magnetpartikel können also ohne Einschränkungen im SELEX-Prozess eingesetzt werden. Auch die Analytik in Form der Real Time PCR erfüllt die gestellten Anforderungen und wird daher weiterhin zur Überwachung des SELEX-Prozesses eingesetzt.

### **Amplifikation der Aptamerkandidaten**

Nach erfolgter Elution aus ihren Komplexen müssen die Aptamerkandidaten in einer PCR für die nächste Selektionsrunde vervielfältigt werden. Im SELEX-Prozess ist diese Amplifikation als multitemplate PCR zu klassifizieren (siehe: *Theorie zur Amplifikation von Aptamerkandidaten* auf S. 20). Wegen der großen Komplexität der Probe entstehen zusätzlich zum „regulären“ Produkt mit etwa 80 bp auch Nebenprodukte der Länge von etwa 160 bp (vgl. Abb. 3.1.17).

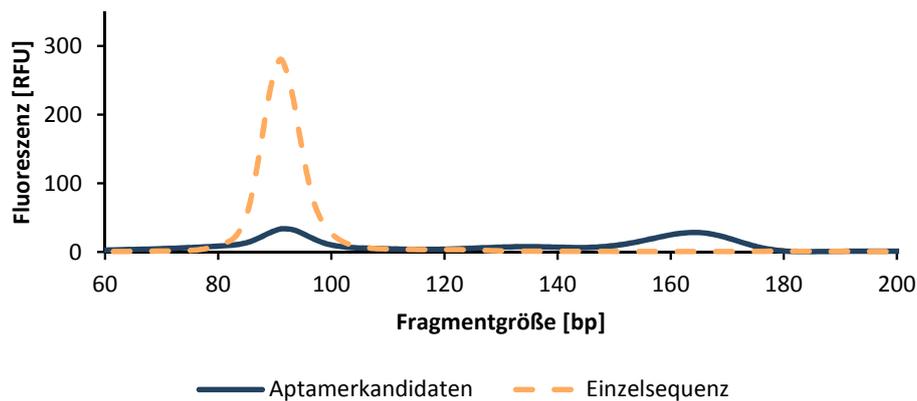


Abb. 3.1.17: Vergleich der Nebenproduktbildung bei der Amplifikation von Aptamerkandidaten und einer Einzelsequenz bei der Verwendung einer Standard-Taq-DNA-Polymerase (GoTaq [Promega]); gemessen mit Bioanalyser (Agilent)

Im SELEX-Prozess ist die Entstehung dieser Nebenprodukte unerwünscht, da die Generierung der Nebenprodukte in Konkurrenz zur Erzeugung funktionsfähiger Aptamerkandidaten steht. Gleichzeitig deutet die Entstehung der Nebenprodukte auf einen signifikanten Bias während der Amplifikation von Aptamerkandidaten hin. So ist wegen der nötigen partiellen Sequenzhomologie davon auszugehen, dass nicht alle Aptamerkandidaten gleichermaßen an der Entstehung der Nebenprodukte beteiligt sind (siehe: *Effekte hoher Diversität* auf S. 21). Dadurch verschieben sich die Häufigkeiten der Sequenzmotive während der Amplifikation, formal handelt es sich hierbei um einen unerwünschten Selektionsdruck während der Amplifikation.

Da Nebenprodukte während der Amplifikation ein signifikantes Hindernis für den Erfolg des SELEX-Prozesses darstellen, wurde die Amplifikation von Aptamerkandidaten mit insgesamt sechs verschiedenen verbesserten Taq-Polymerasen und Nicht-Taq-Polymerasen untersucht (vgl. Abb. 3.1.18; vollständige Daten siehe Anhang: *Entstehung von Nebenprodukten bei Verwendung verschiedener Polymerasen* auf S. 115).

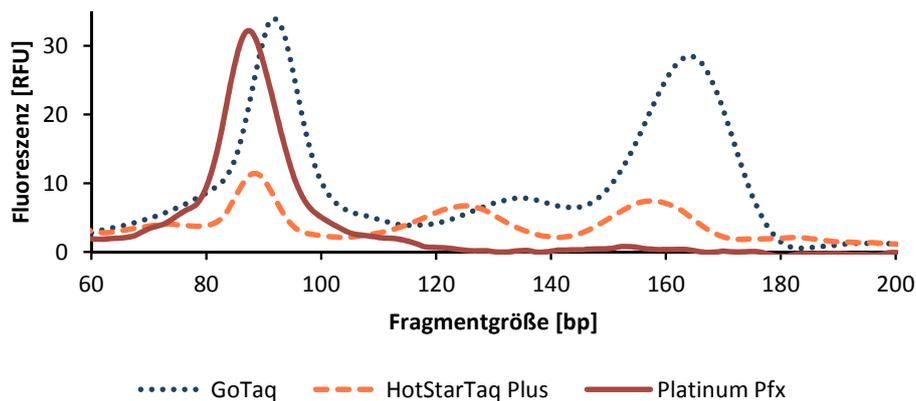


Abb. 3.1.18: Vergleich der Nebenproduktbildung bei Einsatz unterschiedlicher Polymerasen während der Amplifikation von Aptamerkandidaten (exemplarisch)

Auffällig ist eine Verschiebung der Fragmentgrößen der GoTaq DNA Polymerase im Vergleich zu den anderen Polymerasen. Die Größe der Fragmente in einer Probe wird im Bioanalyser anhand zweier Referenz-Fragmente ermittelt. Da die Proben seriell gemessen werden, driften diese Referenz-Fragmente leicht. Der Hersteller gibt für die Genauigkeit der Längenbestimmung einen Fehler von  $\pm 10\%$  an. Daher ist davon auszugehen, dass diese Verschiebung kein echter Längenunterschied der Fragmente in der Probe ist, sondern dass es sich hier um ein Messartefakt handelt. Während im PCR-Produkt der GoTaq DNA Polymerase erneut die Bildung von Nebenprodukten mit etwa 160 bp zu beobachten ist, beinhaltet das PCR-Produkt der HotStarTaq Plus Polymerase [Qiagen] eine zusätzliche Fraktion an Nebenprodukten mit etwa 120 bp. Von den sechs getesteten Polymerasen liefert lediglich die Platinum Pfx Polymerase von Thermo Scientific ein PCR-Produkt ohne messbare Mengen an Nebenprodukten. Für alle weiteren Versuche wurde daher die Pfx Polymerase eingesetzt. Um die im SELEX-Prozess benötigten Mengen an Aptamerkandidaten aufzubringen wurden hier zwei PCRs hintereinander durchgeführt. So können gleichzeitig von jeder PCR Proben zurückgestellt werden für den Fall, dass in den folgenden Selektionsrunden Probleme auftreten.

### Direkte Generierung einzelsträngiger Aptamerkandidaten

Einzelsträngige Aptamerkandidaten können direkt in einer asymmetrischen PCR generiert werden. Für eine möglichst große Menge an Einzelsträngen im Endprodukt sind sowohl das Konzentrationsverhältnis, als auch die Gesamtmenge an Primern entscheidend. Wünschenswert ist zunächst die Erzeugung einer ausreichend großen Menge an doppelsträngigen Matrizen für die nachfolgende Generierung der Einzelstränge. Die Literatur gibt das optimale Verhältnis der jeweiligen Primerkonzentrationen mit 20:1 an <sup>(83)</sup>.

Zur Evaluierung der Eignung der asymmetrischen PCR wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Primermengen bei einem konstanten Konzentrationsverhältnis von 20:1 durchgeführt<sup>2</sup>. Ausgangsmaterial für die asymmetrische PCR sind Aptamerkandidaten die in einer separaten regulären PCR voramplifiziert wurden. Nach der asymmetrischen PCR wurden die erhaltenen Produkte in einer PAGE untersucht (vgl. Abb. 3.1.19).

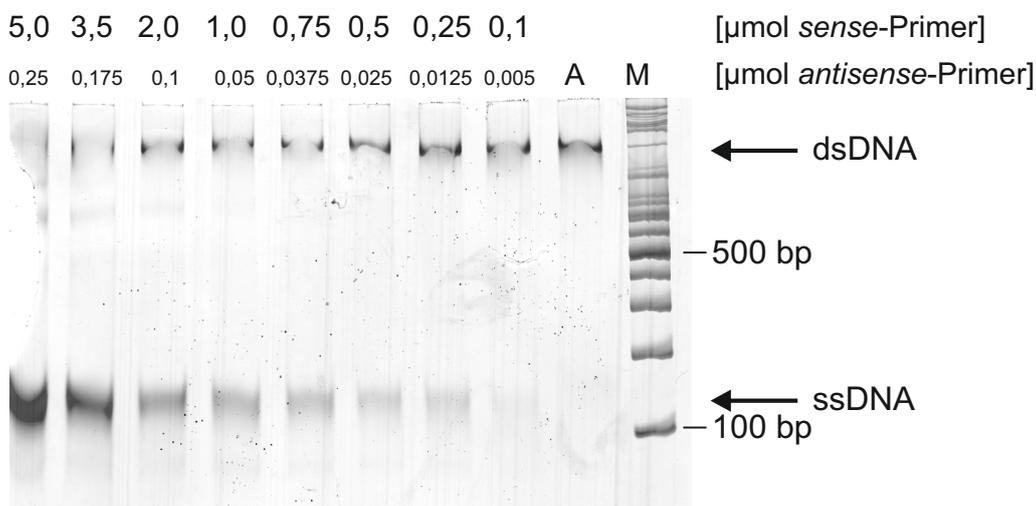


Abb. 3.1.19: PCR-Produkte der asymmetrischen PCR mit variierender Primermenge bei einem konstanten Primerverhältnis von 20:1; Vergleich zum Ausgangsmaterial (A) und Marker (M; 100 bp DNA Marker); PAGE mit Silberfärbung

---

<sup>2</sup> siehe Bachelorarbeit von Zawadi Hellmann "Analyse von Technologien zur Erzeugung von DNA-Einzelsträngen aus PCR-Produkten" (2014)

## Experimente zur Selektion von Aptameren

Das Ausgangsmaterial (A), ein reguläres PCR-Produkt, enthält lediglich Doppelstränge, während die Produkte der asymmetrischen PCR zusätzlich einzelsträngige Aptamerkandidaten enthalten. Dabei korreliert deren Menge direkt mit der Gesamtmenge der eingesetzten Primer. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auf die zusätzliche Generierung des Matrizenmaterials verzichtet werden kann, dazu wurden asymmetrische PCRs mit und ohne *antisense*-Primer durchgeführt (vgl. Abb. 3.1.20).

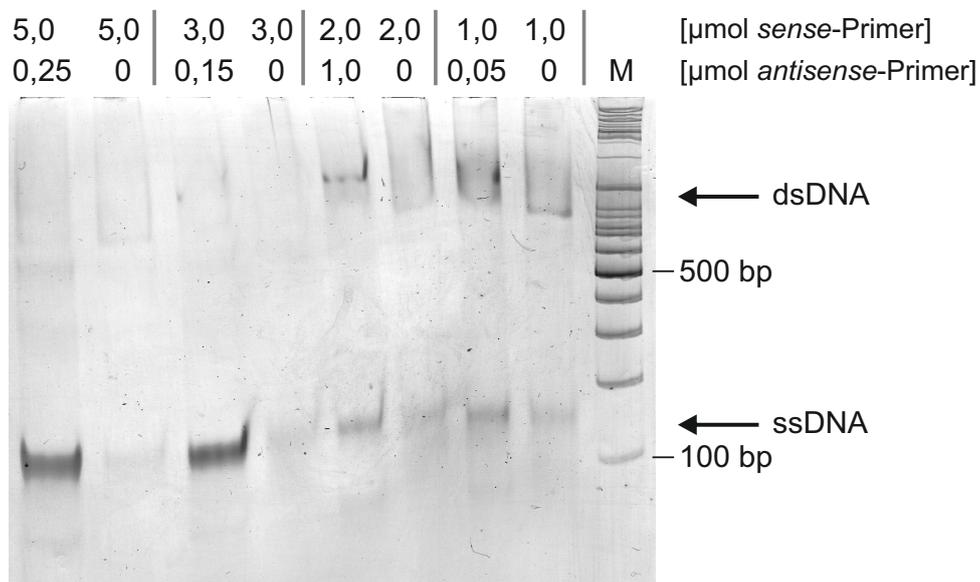


Abb. 3.1.20: Vergleich der PCR Produkte aus asymmetrischer PCR mit und ohne integrierter Generierung von Matrizenmaterial bei variierender Menge an *sense*- und *antisense*-Primer. Marker (M; 100 bp DNA Marker); PAGE mit Silberfärbung

Wieder ist eine Zunahme der Menge an generierten Einzelsträngen mit erhöhter Primermenge zu beobachten. Gleichzeitig liefert die asymmetrische PCR ohne *antisense*-Primer im Vergleich zur asymmetrischen PCR mit integrierter Generierung von Matrizenmaterial signifikant weniger einzelsträngige Aptamerkandidaten. Für eine Produktion einer möglichst großen Menge an einzelsträngigen Aptamerkandidaten sollte die asymmetrische PCR also stets mit beiden Primern in einem Konzentrationsverhältnis von 20:1 mit 5  $\mu\text{M}$  *sense*-Primer und 0,25  $\mu\text{M}$  *antisense*-Primer durchgeführt werden.

Nachfolgend zur asymmetrischen PCR müssen die einzelsträngigen Aptamerkandidaten aus dem PCR-Produkt isoliert werden. Diese liegen dabei neben den doppelsträngigen Komplexen aus Aptamerkandidaten mit ihren komplementären Strängen und weiteren Reaktionsprodukten der PCR vor.

Eine direkte Isolation der einzelsträngigen Aptamerkandidaten aus dem PCR-Produkt über Gele wurde aufgrund der stark limitierten Eingangsmenge verworfen. Als Alternative wurden zunächst die Komplexe der Aptamerkandidaten mit ihren komplementären Strängen über den am *antisense*-Strang angebrachten Biotin-Tag abgereichert. Dazu wurde das PCR-Produkt mit Streptavidin-Magnetpartikeln inkubiert, die selektiv die biotinylierten Komplexe binden. Im Überstand über den Magnetpartikeln verblieben dann lediglich die einzelsträngigen Aptamerkandidaten und die restlichen Bestandteile der Reaktionsmischung. Die nachfolgende Abtrennung dieser verbleibenden Bestandteile über ein kommerzielles Kit zur Aufreinigung von DNA aus PCR-Produkten scheiterte aber an der zu geringen Affinität der einzelsträngigen Aptamerkandidaten für die stationäre Phase. Die Kits sind für längere doppelsträngige Fragmente optimiert, die Aptamerkandidaten mit ca. 80 bp dagegen sehr kurz und zudem einzelsträngig. Mögliche weitere Verfahren, wie beispielsweise die Fällung der einzelsträngigen Aptamerkandidaten, wurden wegen des hohen zeitlichen Aufwands nicht weiter verfolgt.

Da die Aptamerkandidaten nachträglich mit großem Aufwand isoliert werden müssen, wurde die asymmetrische PCR nicht in den SELEX-Prozess integriert und stattdessen eine alternative Isolation von einzelsträngigen Aptamerkandidaten aus regulären PCR-Produkten realisiert.

### **Gewinnung einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus PCR-Produkten**

Alternativ zur direkten Erzeugung von einzelsträngigen Aptamerkandidaten können diese auch aus regulären PCR-Produkten gewonnen werden. In diesem Modellprozess beruht die spätere Abtrennung des *antisense*-Stranges auf der Bindung von Biotin, das am *antisense*-Primer verankert ist.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Zur Rückgewinnung der amplifizierten Aptamerkandidaten wird das biotinylierte PCR-Produkt zunächst für 10 Minuten gemeinsam mit Streptavidin-Magnetpartikeln inkubiert (vgl. Abb. 3.1.21). Eine erhöhte Konzentration an Natriumchlorid von 1 M stabilisiert die Komplexbildung zwischen dem Biotin des *antisense*-Strangs und dem immobilisierten Streptavidin während der Inkubation <sup>(84)</sup>. Nach der Immobilisierung können die restlichen Bestandteile der PCR in Waschschritten entfernt werden, sodass lediglich die Aptamerkandidaten in ihren *antisense*-Strang-Komplexen auf den Magnetpartikeln verbleiben. Durch den Einsatz von 100 mM Natronlauge wird die Hybridisierung zwischen den Aptamerkandidaten und ihrem entsprechenden *antisense*-Strang gestört, sodass sich die Aptamerkandidaten von diesen lösen und in die mobile Phase übergehen. Gleichzeitig verbleiben die *antisense*-Stränge über ihre Biotinmodifikation immobilisiert, sodass die mobile Phase lediglich die Aptamerkandidaten enthält. Direkt nach Abtrennung der Magnetpartikel muss die Natronlauge durch Zusatz von Kaliumdihydrogenphosphat neutralisiert werden, da sonst die Aptamerkandidaten durch alkalische Hydrolyse geschädigt werden. Abschließend erfolgt die Rekonditionierung der Aptamerkandidaten als Vorbereitung für die nächste Selektionsrunde durch Hitzedenaturierung und Renaturierung in der chemischen Umgebung des Selektionspuffers.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

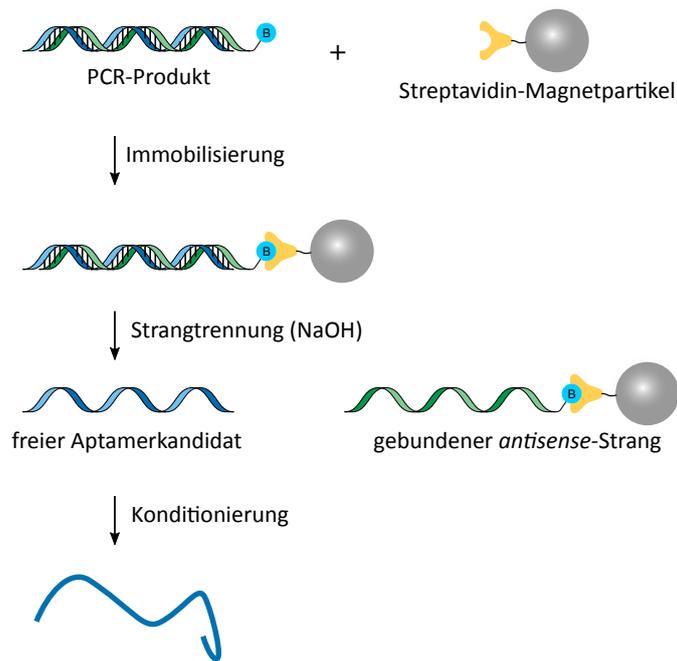


Abb. 3.1.21: Isolierung einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus PCR-Produkten unter Verwendung eines biotinylierten *antisense*-Stranges

Zur Optimierung dieses Prozessschrittes wurde eine Versuchsreihe mit jeweils unterschiedlichen Mengen Magnetpartikeln der Firmen Biomag und Invitrogen durchgeführt. Um für alle Ansätze homogenes Ausgangsmaterial zu erhalten, wurden Aptamerkandidaten im größeren Maßstab amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend gepoolt. Zu den jeweiligen Mengen der Magnetpartikeln wurden dann je 100  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt gegeben und eine Strangtrennung durchgeführt. Danach wurden die erhaltenen Proben in einer nativen PAGE mit Silberfärbung auf ihren Gehalt an Einzelsträngen (ssDNA), verbleibenden Doppelsträngen (dsDNA) oder anderen Verunreinigungen aus dem Prozess untersucht (vgl. Abb. 3.1.22).

## Experimente zur Selektion von Aptameren

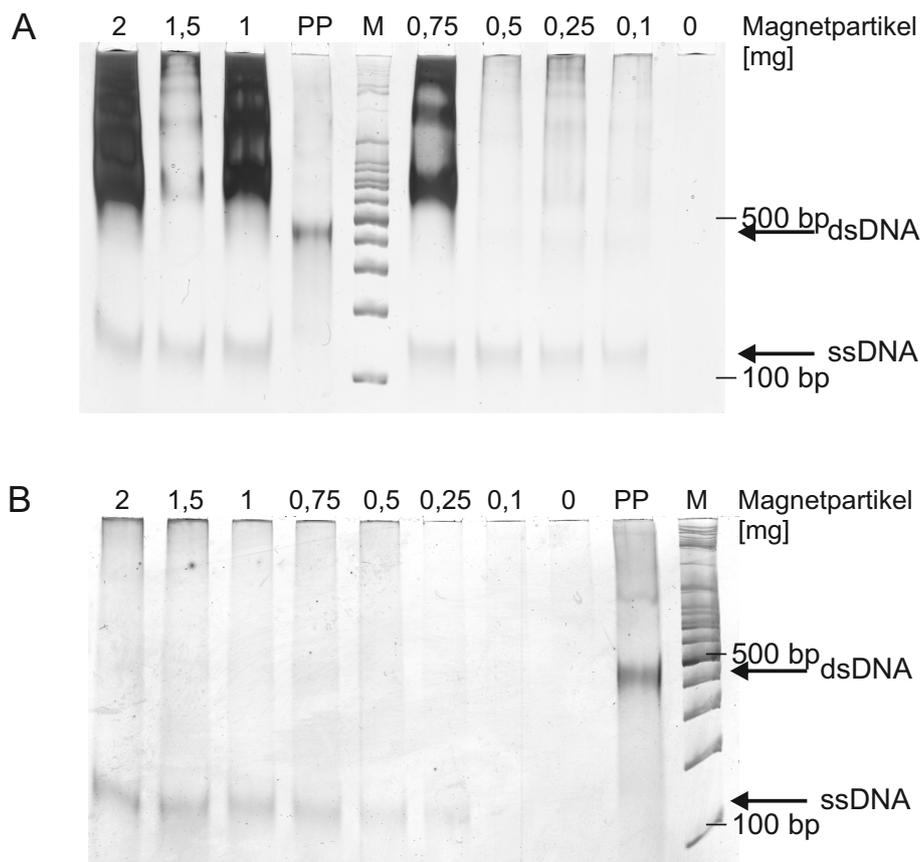


Abb. 3.1.22: Erzeugte einzelsträngige Aptamerkandidaten unter der Verwendung verschiedener Mengen an Streptavidin-Magnetpartikeln der Firma Biomag (A) und Invitrogen (B). Vergleich zum PCR-Produkt (PP) und Marker (M; 100 bp DNA Marker); PAGE mit Silberfärbung

Wie erwartet zeigt das PCR-Produkt (PP) als DNA-Doppelstrang ein deutlich anderes Laufverhalten als die isolierten DNA-Einzelstränge (ssDNA). Für die Magnetpartikel der beiden Hersteller korreliert die Ausbeute an Einzelsträngen mit der Menge an eingesetzten Magnetpartikeln. Die Magnetpartikel der Firma Biomag geben jedoch zusätzlich eine große Menge unerwünschter Stoffe ab. Durch Einsatz der Silberfärbung nach einer Färbung des Gels mit SYBR Green II konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen unerwünschten Stoffen nicht um Nukleinsäuren handelt. Nach dem Ausschlussprinzip muss es sich hier also um Streptavidin handeln, dass von den Magnetpartikeln abgelöst wurde. Insbesondere die am abgewaschenen Streptavidin anhaftenden Doppelstränge sollten jedoch nicht in die nächste Selektionsrunde eingehen. Daher sind die Magnetpartikel der Firma

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

Biomag trotz der beworbenen größeren Kapazität nicht für die Verwendung im SELEX-Prozess geeignet. Im Gegensatz dazu enthalten die Proben aus der Strangtrennung mit den Magnetpartikeln der Firma Invitrogen neben den gewünschten DNA-Einzelsträngen keine detektierbaren Doppelstränge oder andere Verunreinigungen.

Zusätzlich wurde die maximale Kapazität der Magnetpartikel untersucht. Dazu wurden nach dem entwickelten Protokoll Einzelstränge aus PCR-Produkt isoliert, wobei die Menge an Magnetpartikeln jeweils variiert und die Menge an angebotenen PCR-Produkt konstant gehalten wurde (vgl. Abb. 3.1.23). Die Menge an erhaltenen Einzelsträngen wurde dann in der Real Time PCR analysiert.

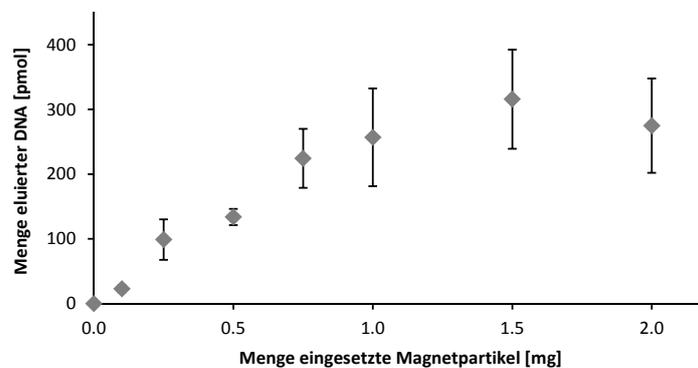


Abb. 3.1.23: Menge an eluierten Einzelsträngen von Streptavidin-Magnetpartikeln der Firma Invitrogen; PAGE mit Silberfärbung

Die Menge an erhaltenen Einzelsträngen steigt dabei zunächst beinahe linear an. Ab 1 mg Magnetpartikeln kommt es jedoch zu einer Limitierung der erhaltenen Menge an Einzelsträngen obwohl mehr Magnetpartikel angeboten wurden. Dies zeigt eine Erschöpfung der biotinylierten Doppelstränge in dem PCR-Produkt an. Die Bestimmung der maximalen Kapazität kann daher nur im Bereich von 0,1 mg bis 0,75 mg Magnetpartikeln erfolgen. Für diesen Bereich wurden die erhaltenen Mengen an Einzelsträngen pro mg Magnetpartikeln berechnet und gemittelt. Die maximale Kapazität liegt demnach bei etwa 300 pmol Einzelsträngen pro mg Magnetpartikel.

Der Selektionsdruck der späteren SELEX soll je nach Zyklus zwischen 1 zu 10 bis 1 zu 20 liegen. Die Zielmoleküle werden dabei typischerweise in einer Menge von 10 pmol bis 25 pmol eingesetzt, sodass bis zu 500 pmol einzelsträngige Aptamerkandidaten für eine Selektionsrunde benötigt werden. Für eine Strangtrennung werden daher 2 mg Streptavidin–Magnetpartikel eingesetzt, um mit etwa 600 pmol eine ausreichend große Kapazität zur Erzeugung der einzelsträngigen Aptamerkandidaten zu erreichen. Gleichzeitig ist eine nachträgliche Reinigung der erhaltenen Einzelstränge nicht erforderlich, sodass die Aptamerkandidaten direkt in die nächste Selektionsrunde eingehen können.

### 3.1.4 Automatisierung des SELEX-Prozesses

Auch die Automatisierung des SELEX-Prozesses ist Teil dieser Arbeit. Da die Selektion auf Basis von Magnetpartikeln ausgeführt wird, liegt hier die Verwendung eines Magnetpartikel-Prozessors nahe. Der KingFisher von Thermo Scientific ist ein solcher Magnetpartikel-Prozessor, der ursprünglich für automatisierte Isolierungsprotokolle von DNA/RNA oder Proteinen entwickelt wurde.

Über die Steuerungssoftware kann analog zu den Isolierungsprotokollen auch ein Selektionsschritt für den SELEX-Prozess programmiert werden. Dabei sind die jeweiligen Inkubationszeiten und Mischzeiten frei wählbar, während die Mischgeschwindigkeit in Geschwindigkeitsstufen einstellbar ist. Der KingFisher führt dann das programmierte Protokoll aus. Im Inneren befinden sich magnetische Metallstäbe, die mit einer Schutzkappe versehen in die Lösung einer 96-Well-Platte abgesenkt werden können und so die Magnetpartikel über die Platte transportieren. Im Gegensatz zu einer Isolation von Hand müssen die entsprechenden Lösungen daher vor Beginn der Selektion in der 96-Well-Platte hinterlegt werden.

Für die Durchführung eines Selektionsschrittes im Magnetpartikel-Prozessor gelten prinzipiell die selben Anforderungen wie für eine Selektion von Hand. Daher wurde die Verschleppung von Flüssigkeit mit den Magnetpartikel bestimmt<sup>1</sup>. Da-

---

<sup>1</sup> siehe Masterarbeit von Roman Hilje "Automation of an *in vitro* selection process" (2015)

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

zu wurde Fluoresceinlösung eingesetzt, deren Verschleppung in andere Wells dann mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen wurde. So ist die Verschleppung unabhängig von der Menge der Magnetpartikel bei Einsatz des KingFisher etwa nur halb so groß wie bei der Bearbeitung von Hand (etwa 1  $\mu\text{l}$  zu 2  $\mu\text{l}$ ).

Für den KingFisher wurde ebenfalls eine Selektion des 6H7-Aptamers simuliert, die analog zu der manuellen simulierten Selektion verläuft (siehe: *Inkubation mit Zielmolekülen und Trennverfahren in der SELEX* auf S. 55) (vgl. Abb. 3.1.24) <sup>2</sup>. Dazu wurden im KingFisher je 200 pmol 6H7-Aptamer und entweder mit His-Tag-Magnetpartikeln (BSTE-His) oder mit leeren und blockierten Magnetpartikeln (Negativkontrolle) inkubiert. Die Magnetpartikel wurden zweimal gewaschen und anschließend wurde das gebundene 6H7-Aptamer mit Imidazol eluiert. Die Mengen an 6H7-Aptamer in den jeweiligen Fraktionen wurden mit der Real Time PCR bestimmt.

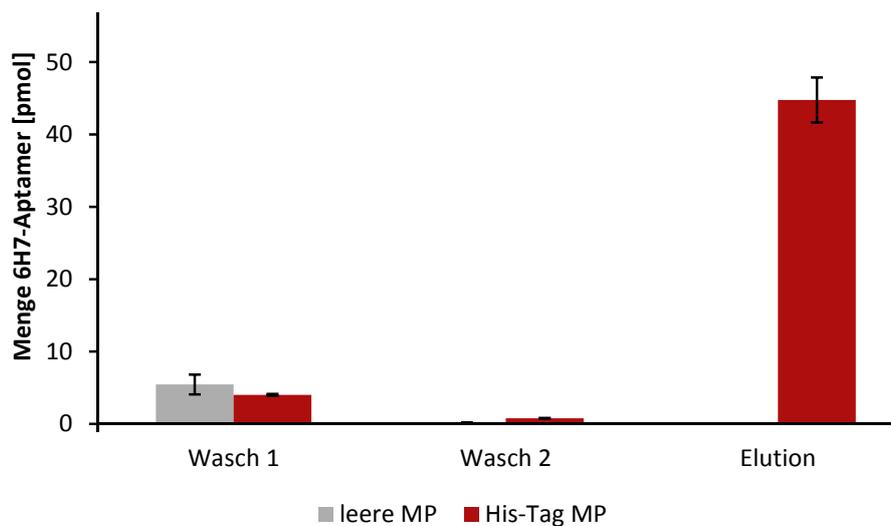


Abb. 3.1.24: Test der automatisierten Selektion mit dem 6H7-Aptamer gegen immobilisierte His-Tag Proteine (BSTE-His) im Vergleich zu leeren Magnetpartikeln (Negativkontrolle)

Ähnlich wie bei der manuellen Selektion enthält die erste Waschfraktion der His-Tag-Magnetpartikel etwa die selbe Menge an 6H7-Aptamer wie die erste Waschfraktion der Negativkontrolle. Wiederum liegt die Menge an 6H7-Aptamer in der zweiten Waschfraktion sowohl für die His-Tag-Magnetpartikel als auch für die

Negativkontrolle niedriger als in der ersten Waschfraktion. In der Elutionsfraktion finden sich dagegen keine Aptamere in der Negativkontrolle, während die Probe der His-Tag-Magnetpartikel etwa 45 pmol 6H7-Aptamer enthält. Dies bestätigt, dass die simulierte Selektion erfolgreich automatisiert wurde.

Aufgrund des erhöhten Aufwands für das Einfüllen bzw. das Entnehmen der Lösungen vor Beginn und nach Ende einer Selektion ist der Einsatz des KingFishers erst im Szenario mit mehreren parallelen Selektionen sinnvoll. Hier bringt die parallele Ausführung jedoch große Vorteile.

### 3.1.5 *Proof of principle* für den minimalen SELEX-Prozess

Nach Abschluss der Optimierungen soll nun die Funktionalität der entwickelten minimalen SELEX gezeigt werden. Dazu soll ein Selektionsprozess gegen den His-Tag das erfolgreiche Zusammenspiel der einzelnen optimierten Arbeitsschritte des Gesamtsystems demonstrieren. Obwohl in der Literatur bereits einige Aptamere gegen den His-Tag beschrieben sind, soll dieser SELEX als reine *de novo* Selektion aufgestellt sein. Dementsprechend besteht die eingesetzte Bibliothek vollständig aus unselektierten Aptamerkandidaten mit totalrandomisierter zentraler Region. Zunächst werden sowohl die Aptamerkandidaten als auch die immobilisierten Zielmoleküle (BSTE-His) im Selektionspuffer für die Selektion konditioniert. Nach einer gemeinsamen Inkubation für 30 Minuten folgten 3 Waschschritte mit je 5 Minuten und 1 ml Selektionspuffer. Für die Elution wurde das Puffersystem vom Selektionspuffer zu PBS gewechselt, da die im Selektionspuffer enthaltenen zweiwertigen Ionen ( $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ), sowie das Copolymer poly(dI-dC) die nachfolgende Amplifikation in der PCR stören können. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C. Durch die thermisch induzierte Denaturierung der Aptamer- und Proteinstrukturen werden die Aptamerkandidaten in die flüssige Phase freigesetzt, während die kovalent gebundenen Zielmoleküle auf den Magnetpartikeln zurückbleiben. Die freien Aptamerkandidaten konnten so durch Entnahme der flüssigen Phase von den Zielmolekülen abgetrennt werden. Vorteil dieser Methode ist die nahezu vollständige Freisetzung der Aptamerkandidaten

## Experimente zur Selektion von Aptameren

aus ihren Komplexen. Nachteile sind die fehlende Fraktionierbarkeit nach Affinität und die fehlende Möglichkeit der Wiederverwendung einmal behandelter Zielproteine, da diese irreversibel denaturiert werden. Die so eluierten Aptamerkandidaten wurden in zwei aufeinander folgenden PCRs amplifiziert und anschließend durch den Einsatz von Streptavidin-Magnetpartikeln von ihrem *antisense*-Strang getrennt. Nach einer erneuten Konditionierung konnten die Aptamerkandidaten dann in die nächste Selektionsrunde eingesetzt werden.

Für diesen Modellprozess wurden insgesamt 9 Selektionsrunden durchgeführt. Zu Beginn des SELEX-Prozesses, in der ersten Selektionsrunde, beträgt das Verhältnis von Aptamerkandidaten zu Zielmolekülen 10:1 (1.000 pmol Aptamerkandidaten / 100 pmol Zielmoleküle). Ab der zweiten Selektionsrunde besteht die Bibliothek lediglich aus Aptamerkandidaten, die bereits in einer vorherigen Selektionsrunde an das Zielmolekül gebunden haben. Daher wurde der Selektionsdruck auf 20:1 erhöht (500 pmol Aptamerkandidaten / 25 pmol Zielmoleküle). Die Real Time PCR wurde eingesetzt um die Ein- und Ausgangsbilanzen für die jeweiligen Schritte in den unterschiedlichen Selektionsrunden zu bestimmen, die jedoch keine signifikanten Änderungen anzeigen. Im Kontrast dazu zeigen die Schmelzkurven der jeweiligen PCR-Produkte eine deutliche Entwicklung im Verlauf des SELEX-Prozesses (vgl. Abb. 3.1.25).

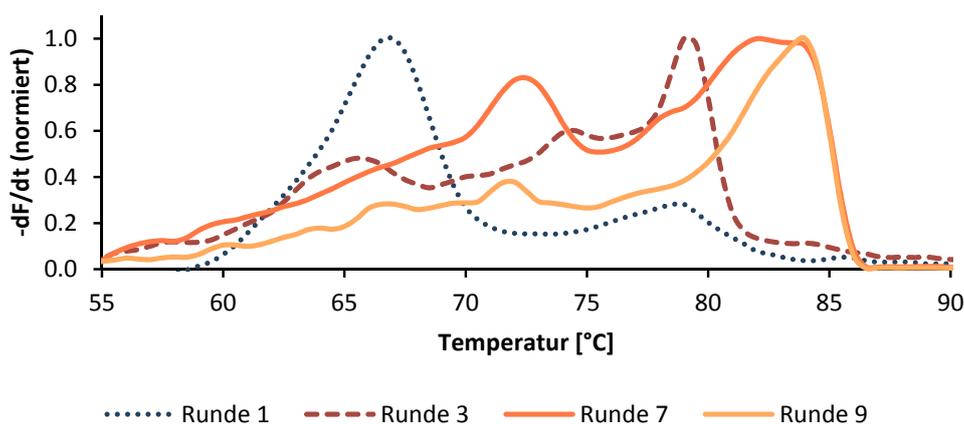


Abb. 3.1.25: Schmelzkurven der PCR-Produkte verschiedener Selektionsrunden in der His-Tag-SELEX

Das PCR-Produkt aus Selektionsrunde 1 enthält vorwiegend Heteroduplexe, deren Schmelzpunkte bei 67 °C liegt, und nur einen kleinen Anteil Heteroduplexe mit geringerem Grad an Fehlpaarung und Schmelzpunkt um 79 °C. Dieser Anteil vergrößerte sich mit Fortschreiten der Selektion in die dritte Runde, während gleichzeitig der Anteil an Heteroduplexen mit Schmelzpunkt von 67 °C zurückgegangen ist und neue Heteroduplexe mit Schmelzpunkten um 75 °C auftraten. In Selektionsrunde 7 sind die Heteroduplexe mit Schmelzpunkt bei 67 °C fast vollständig verschwunden, ein Teil der Amplifikate sind Heteroduplexe mit einem Schmelzpunkt von 73 °C während der Hauptteil der Amplifikate als einen Schmelzpunkt zwischen 82 °C und 84 °C aufweist, was auf reine Homoduplexe hinweist. In der letzten Selektionsrunde (Runde 9) besteht das PCR-Produkt nahezu vollständig aus Homoduplexen mit einer Schmelztemperatur von 84 °C, lediglich ein kleiner Anteil an Heteroduplexen mit einen Schmelzpunkt von 73 °C verbleibt. Anhand der entwickelten Diversitätsstandards für die Real Time PCR können die Diversitäten der PCR-Produkte in der SELEX geschätzt werden (siehe: *Diversitätsstandards für die Real Time PCR* auf S. 45). So reduzierte sich die Diversität des PCR-Produkts von > 14 N in der ersten Selektionsrunde auf > 10 N für das PCR-Produkt der dritten Runde, auf < 10 N in der siebten und < 8 N in der neunten Selektionsrunde. Diese Abnahme der Diversität ist auch in der direkten Analyse der PCR-Produkte auf einem Polyacrylamid-Gel ersichtlich (vgl. Abb. 3.1.26).

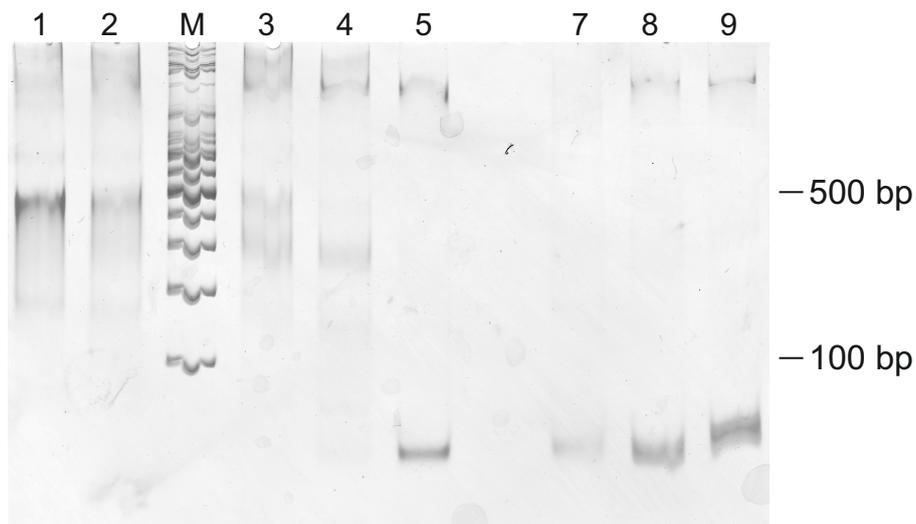


Abb. 3.1.26: PAGE der PCR-Produkte aus dem His-Tag SELEX (PCR-Produkt aus Runde 6 bereits aufgebraucht); Marker (M; 100 bp DNA Marker); Silberfärbung

Ähnlich zu Unterschieden in den Schmelzkurven gibt es Unterschiede zwischen Heteroduplexen und Homoduplexen auch in der elektrophoretischen Mobilität (siehe: *Länge und Hybridisierungsstatus von Aptamerkandidaten* auf S. 51). Da Heteroduplexe ungepaarte Bereiche aufweisen, ist deren elektrophoretische Mobilität gegenüber den Homoduplexen niedriger<sup>(82)</sup>. So spiegelt die gesunkene scheinbare Amplifikatlänge eine reduzierte Bildung von Heteroduplexen und damit eine verminderte Komplexität der Probe wieder.

Die Amplifikate der Selektionsrunden 1 und 2 erscheinen etwa 450 bp groß. In Runde 3 finden sich daneben noch Amplifikate mit einer scheinbaren Größe von 300 bp. In Runde 4 finden sich lediglich Amplifikate, die bei 300 bp erscheinen. Ab Runde 5 erscheinen alle Amplifikate kleiner als 100 bp und zeigen das erwartete Laufverhalten von Homoduplexen der Größe von 78 bp (siehe: *Bereitstellung der Aptamerkandidaten* auf S. 37). Diese Ergebnisse bestätigen die in der Real Time PCR beobachtete Erniedrigung der Diversität in den angereicherten Bibliotheken der Aptamerkandidaten.

Trotz der Abnahme der Diversität ist die eluierte Menge an Aptamerkandidaten in den einzelnen Selektionsschritten relativ konstant. Dies lässt sich durch die kon-

stante Menge an angebotenem Target erklären. Gleichzeitig limitiert zudem der Selektionsdruck auf die Aptamerkandidaten in den Waschschrritten die eluierte Menge. Dass im Verlauf der Selektionsrunden die Diversität in der Bibliothek der Aptamerkandidaten abnimmt, zeigt daher eine erfolgreiche Selektion an. Diese Daten demonstrieren eindrucksvoll den Effekt der Selektion auf die Bibliothek der Aptamerkandidaten und bestätigen damit, dass im Modellprozess alle Einzelschritte gut aufeinander abgestimmt sind. Der hier entworfene Modellprozess ist daher auch als vollwertige *de novo* Selektion einsetzbar.

### 3.2 Selektion von Aptameren gegen das ATP7B-Protein

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der entwickelte SELEX-Prozess sowie seine Analytik funktionsfähig ist, soll nun mit der *de novo* Selektion eines Aptamers gegen das Wilson-Protein (ATP7B) begonnen werden. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle im Kupferstoffwechsel und besteht aus insgesamt acht Transmembrandomänen, einer ATP-Bindestelle (N-Domäne), einer Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne), einer Phosphatasedomäne (A-Domäne) und 6 N-terminalen Kupferbindestellen (vgl. Abb. 3.2.1) <sup>(85)</sup>.

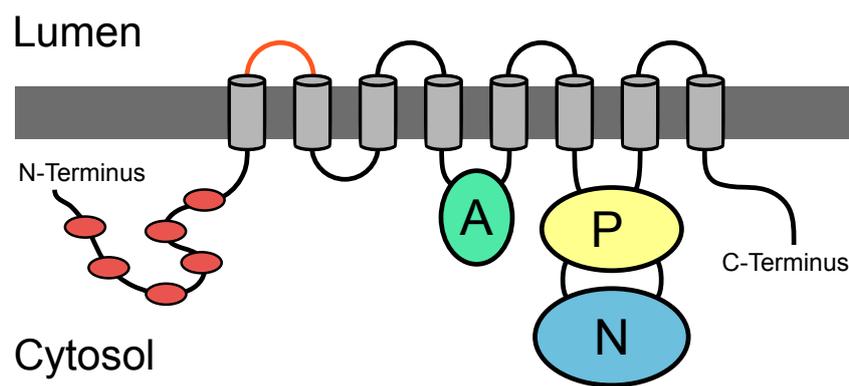


Abb. 3.2.1: Schematischer Aufbau des Proteins ATP7B: acht Transmembrandomänen, ATP-Bindestelle (N), Phosphorylierungsdomäne (P), Phosphatasedomäne (A) und 6 N-terminalen Kupferbindestellen <sup>nach (86)</sup>

Die Wilson-Krankheit liegt als seltene genetische Erkrankung nicht im Fokus der Pharmaforschung. Für Untersuchungen der Krankheit werden daher bis heute polyklonale Antikörper durch Immunisierung in Kaninchen hergestellt. Dabei unterliegt die Qualität der erhaltenen Antikörper starken Schwankungen, sodass die histologischen Untersuchungen erschwert werden. Als Ersatz für diese Antikörper soll ein Aptamer entwickelt werden, das wesentlich geringere Qualitätsschwankungen aufweist.

Insbesondere die hydrophoben Transmembrandomänen stellen jedoch signifikante Hindernisse in der SELEX dar, sodass ATP7B nicht in seiner Gesamtstruktur als Zielmolekül verwendet werden kann. Stattdessen wurde die Nukleotid-Bindedomäne (N-Domäne) als Zielmolekül für den SELEX-Prozess ausgewählt. Diese stellt mit etwa 16,9 kDa und 161 Aminosäuren nur einen kleinen Teil des gesamten Proteins dar, der jedoch vollständig im hydrophilen Milieu liegt. Der isoelektrische Punkt der N-Domäne liegt bei 5,0, der pH-Wert des Selektionspuffers mit 7,4 nahe dem physiologischen pH-Wert im Cytosol (7,0 – 7,3). Es entsteht eine leichte elektrostatische Repulsion zwischen dem Protein mit seiner negativen Nettoladung und den Aptamerkandidaten als Polyanion. Unspezifische ladungsgetriebene Interaktionen zwischen Aptamerkandidaten und N-Domäne werden daher nicht erwartet.

### 3.2.1 Herstellung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne

Für den SELEX-Prozess muss die N-Domäne des ATP7B auf Magnetpartikeln immobilisiert werden. Da die dreidimensionale Faltung des Zielproteins möglichst der nativen Faltung entsprechen soll, wurde hier auf eine direkte Immobilisierung der N-Domäne verzichtet. Stattdessen soll die N-Domäne als Fusionsprotein mit einem Affinitäts-Tag produziert werden, sodass sie nicht an der Immobilisierungsreaktion teilnimmt und so ihre native Faltung einnehmen kann (vgl. Abb. 3.2.2). Hier wurde der sogenannte IMPACT-Tag der Firma New England Biolabs (NEB) eingesetzt, dieser vereint eine Chitinbindedomäne und ein durch Dithiothreitol (DTT) aktivierbares Intein, eine selbstspaltende Protease. So kann das Fusionsprotein in der Aufreinigung aus dem Zelllysat durch die Bindung an Chitin von an-

## Experimente zur Selektion von Aptameren

deren Zellbestandteilen getrennt werden. In fortgeschrittenen Selektionsstadien kann zusätzlich das aktivierbare Intein genutzt werden, um die N-Domäne abzuspalten und selektiv die daran gebundenen Aptamerkandidaten zu eluieren. Die erwarteten molekularen Größen liegen dabei für das Fusionsprotein bei 72,3 kDa, für die Intein/Chitin-Domäne bei 55,0 kDa und für die N-Domäne des ATP7B bei 16,9 kDa.

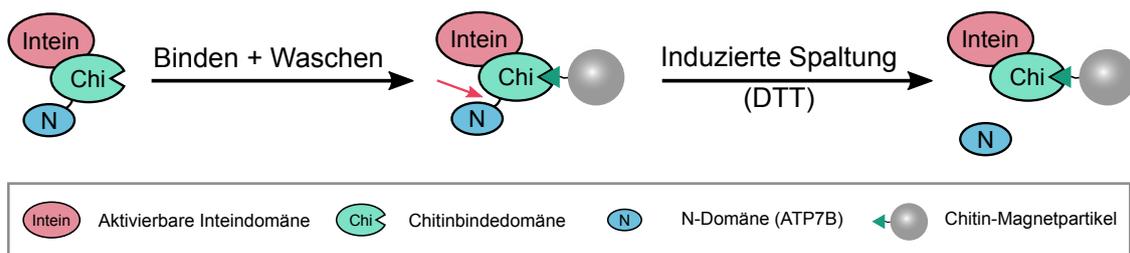


Abb. 3.2.2: Schematische Darstellung des ATP7B-Fusionsproteins und dessen Immobilisierung auf Chitin-Magnetpartikeln; die N-Domäne des ATP7Bs ist mit der Chitinbindedomäne und dem aktivierbaren Intein verknüpft

Grundgerüst des Plasmids zur Produktion des Fusionsproteins ist das kommerziell erhältliche Plasmid pTYB12. Das Plasmid mit Sequenz der N-Domäne wurde von Amelie Stalke bereitgestellt (vgl. Abb. 3.2.3)<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nils von Neuhoff (ehemals Medizinische Hochschule Hannover (MHH), inzwischen Universität Duisburg-Essen / am Universitätsklinikum Essen)

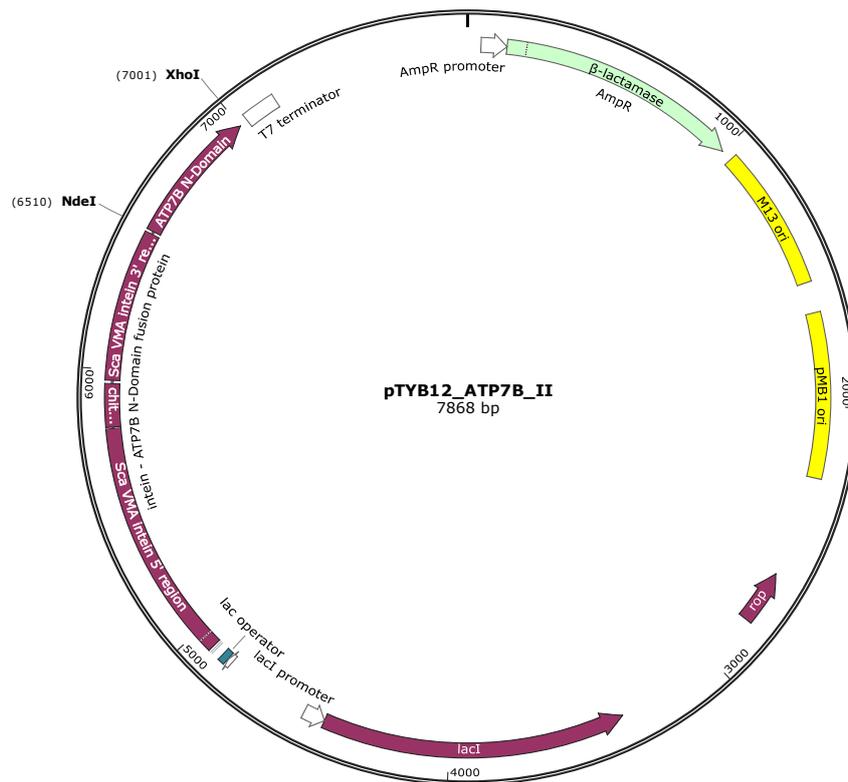


Abb. 3.2.3: Schematischer Aufbau des ATP7B-Plasmids

Das Plasmid verfügt über den Selektionsmarker einer Ampicillinresistenz. Für eine induzierbare Produktion steht das Fusionsprotein unter der Kontrolle eines Lac-Promotors. Als Produzent wurde *E. coli* BL21(DE3) ausgewählt, ein Standardstamm für die Proteinproduktion. Die Bakterien wurden per Hitzeschock transformiert und anschließend vereinzelt.

Vor der Proteinproduktion wurde bei 37°C eine größere Biomasse in *lysogeny Broth*-Medium (LB) angezogen ( $OD_{600} = 1,3$ ). Die Proteinproduktion selbst soll langsamer erfolgen und wurde daher bei nur 24°C unter Verwendung von IPTG über Nacht durchgeführt ( $c = 0,5 \text{ mM}$ ), das Fusionsprotein verbleibt dabei intrazellulär. Nach Abschluss der Proteinproduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet gewaschen.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in Lysispuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall für insgesamt 5 min wobei je nach 30 Sekunden

## Experimente zur Selektion von Aptameren

---

jeweils für 30 Sekunden unterbrochen wurde, um die eingetragene Wärme auf Eis abzuführen. Verbleibende Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation aus dem Lysat entfernt. Die Proteinproduktion wurde in einer SDS-PAGE untersucht (vgl. Abb. 3.2.4).

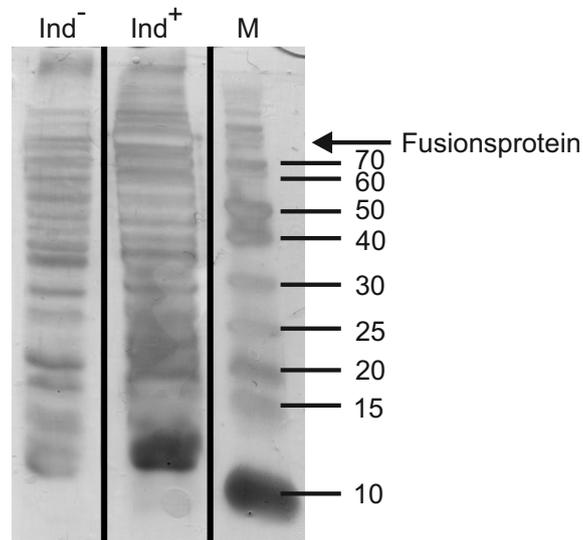


Abb. 3.2.4: Proben der ATP7B-Produktion vor und nach der Induktion mit IPTG (Ind<sup>-</sup>/Ind<sup>+</sup>); Marker (M) [PageRuler Unstained Protein Ladder (10 bis 200 kDa)]; SDS-PAGE mit Silberfärbung

Im Vergleich der Proben zeigt eine zusätzliche Bande mit > 70 kDa in der Probe nach Induktion. Da die erwartete Größe des Fusionsproteins bei 72,3 kDa liegt, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um das gewünschte Fusionsprotein handelt.

Zur Immobilisierung des Fusionsproteins wurde das Lysat gemeinsam mit den Chitin-Magnetpartikeln für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Magnetpartikel dreimal gewaschen um andere Proteine von den Magnetpartikeln zu entfernen. Zur Bestimmung der Reinheit der immobilisierten Proteine wurden die Magnetpartikel in SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Dabei werden die anhaftenden Proteine entfaltet und gehen in den Probenpuffer über. Die erhaltenen Proben wurden anschließend auf einem SDS-Gel mit Coomassie-Färbung untersucht (vgl. Abb. 3.2.5). Zusätzlich wurde auch die gezielte Abspaltung der N-Domäne mit 50 mM DTT getestet.

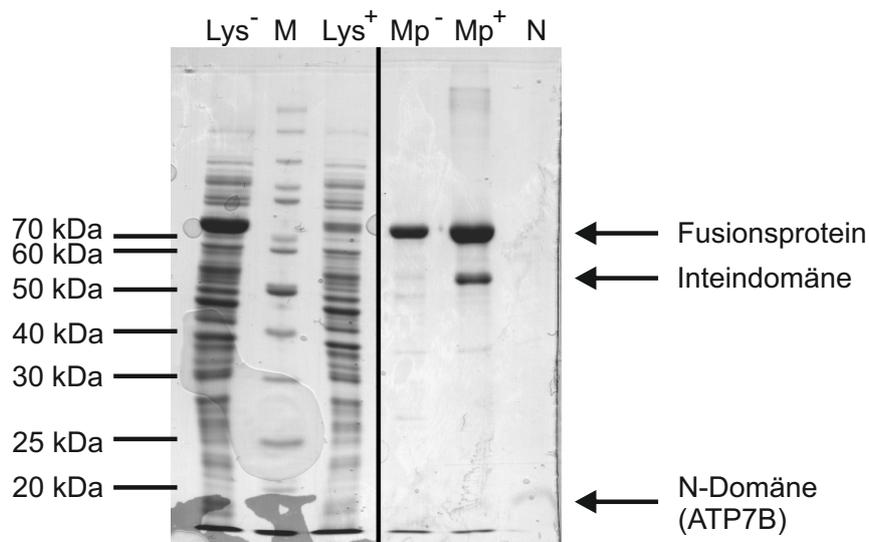


Abb. 3.2.5: ATP7B-Immobilisierung auf Chitinmagnetpartikeln: Lysat vor und nach der Inkubation mit Magnetpartikeln (Lys<sup>-</sup>/Lys<sup>+</sup>); immobilisierte Proteine auf den Magnetpartikeln vor und nach der induzierten Abspaltung der N-Domäne (Mp<sup>-</sup>/Mp<sup>+</sup>); eluierte N-Domäne des ATP7B (N); Marker (M) [PageRuler Unstained Protein Ladder (10 bis 200 kDa)]; SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung

Durch Vergleich des Lysats vor und nach der Inkubation wird deutlich, dass der Hauptteil des etwa 70 kDa großen Fusionsproteins an die Magnetpartikel gebunden hat. Die Bindung an die Magnetpartikel kann auch direkt nachgewiesen werden (Mp<sup>-</sup>). Die Probe der Magnetpartikel nach induzierter Abspaltung der N-Domäne enthält neben dem vollständigen Fusionsprotein zusätzlich ein kleineres Fragment mit etwa 50 kDa, bei dem es sich um die auf den Magnetpartikeln verbleibende Chitin/Intein-Domäne handelt. Die Abspaltung der N-Domäne ist jedoch unvollständig, für einen Einsatz in der SELEX müsste die Abspaltung daher zunächst optimiert werden. Da dies jedoch optional ist, steht die Optimierung nicht im Fokus. In der Elutionsfraktion (N) findet sich dagegen nur ein Fragment der Größe < 20 kDa, die erwartete Größe der N-Domäne liegt dabei bei 16,9 kDa. Die densitometrisch geschätzte Reinheit liegt hier bei 99,2%.

Zur Bestätigung der Identität der N-Domäne wurde diese Bande aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein einer Tandem-Massenspektrometrie unterzogen

(Durchführung: Amelie Stalke<sup>3</sup>. Nach der Spaltung der Disulfidbrücken mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und dem Blocken der Thiolgruppen mit Iodacetamid wurde das Fragment mit Trypsin verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden über eine C18 ZipTip aufgereinigt und konzentriert und anschließend einer MS/MS Analyse unterzogen (Maldi TOF/TOF). Dabei konnten beinahe alle erwarteten Peptide erfasst und für drei Peptide entsprechende Ionenserien gezeigt werden. Die MS-Analyse bestätigt also die Identität der N-Domäne. Gleichzeitig weisen die immobilisierten Proteine eine gute Reinheit auf und können daher im SELEX-Prozess eingesetzt werden.

### 3.2.2 Überlegungen zur Komposition des Selektionspuffers

Bei mehrwöchiger Lagerung fallen aus dem bisher verwendeten Selektionspuffer Calcium- und Magnesiumphosphate aus. Der Puffer ist dann unbrauchbar, da die gewünschten Bedingungen nicht mehr gegeben sind. Aus diesem Grund wird das Phosphat-Ion als Puffersubstanz durch Tris ersetzt, das oft in Puffern für Biomoleküle eingesetzt wird, sodass keine unlöslichen Phosphate mehr gebildet werden können. Zusätzlich wurden weitere Änderungen am Selektionspuffer vorgenommen (vgl. Tab. 3.2.1). So kann auf den Einsatz von BSA als unspezifischer Kompetitor elektrostatischer Interaktionen zwischen Proteinen und Aptamerkandidaten verzichtet werden, da es aufgrund der gleichen negativen Nettoladung zur elektrostatischen Repulsion kommt. Ebenfalls kann auf den Einsatz des poly(dI-dC) Co-Polymers verzichtet werden. Dies ist ein großer Vorteil, da das DNA-ähnliche Polymer in höheren Konzentrationen die nachfolgende PCR stören kann.

---

<sup>3</sup> Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nils von Neuhoff (ehemals Medizinische Hochschule Hannover (MHH), inzwischen Universität Duisburg-Essen / am Universitätsklinikum Essen)

Tab. 3.2.1: Bestandteile und Funktion des verbesserten Selektionspuffers

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Funktion</b>
Tris-Base	25 mM	Puffersubstanz
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	Stabilisierung der Sekundärstruktur
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	Stabilisierung der Sekundärstruktur
KCl	2 mM	Stabilisierung von G-Quadruplexen
NaCl	150 mM	Minderung elektrostatischer Interaktionen
Tween20	0,05 % (v/v)	Minderung hydrophober Interaktionen
pH	7,4	

### 3.2.3 Anwendung der minimalen SELEX und deren Begrenzung

Der Start der Selektion von Aptameren gegen die N-Domäne erfolgt mit 1000 pmol Aptamerkandidaten gegen 100 pmol immobilisierte N-Domäne. Dabei ist die Eingangsmenge in der ersten Selektionsrunde der Selektion größer als in späteren Selektionsrunden, da hier jeder individuelle Aptamerkandidat nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für eine gewisse Affinität zum Ziel aufweist. Für die nachfolgenden Selektionsschritte werden jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Aptamerkandidaten benötigt, die untereinander um die vorhandenen Bindestellen in Konkurrenz treten. Daher sollte die Menge an Aptamerkandidaten zu Beginn der SELEX möglichst groß sein.

Nach dem ersten Selektionsschritt werden die Aptamerkandidaten in zwei aufeinanderfolgenden PCRs amplifiziert, um die benötigte Menge für die nächste Selektionsrunde zu erzeugen. In den nächsten Runden kommen dann 500 pmol Aptamerkandidaten auf 50 pmol ATP7B. Das entspricht einem konstanten Selektionsdruck von etwa 10 zu 1. In der dritten Selektionsrunde entstehen während der Amplifikation der Aptamerkandidaten Nebenprodukte größerer Länge (vgl. Abb. 3.2.6).

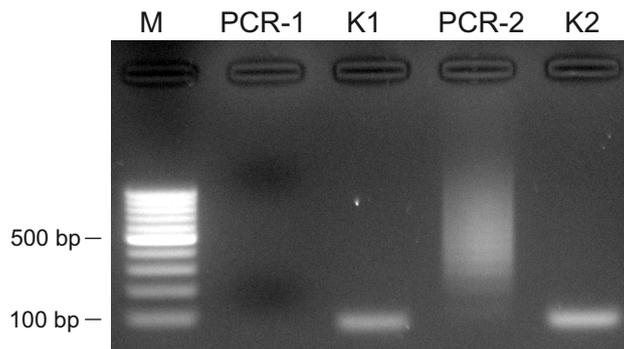


Abb. 3.2.6: Bildung von Nebenprodukten während der zweiten PCR in der dritten Selektionsrunde gegen das ATP7B-Fusionsprotein; Positivkontrollen der Amplifikation (K1 für 1. PCR / K2 für 2. PCR); Marker (M; 100 bp DNA Marker); Agarose-Gel mit Roti Safe Gelstain

Die Eingangsmenge an Aptamerkandidaten in der ersten PCR ist durch den starken Selektionsdruck und die geringe Startmenge in der Selektion sehr niedrig. Erwartungsgemäß ist auf dem Agarose-Gel nach der ersten PCR-Reaktion (PCR-1) kein PCR-Produkt nachweisbar. Erst in der darauffolgenden, zweiten PCR (PCR-2) ist dann ein PCR-Produkt detektierbar. Hier liegt die Länge der erzeugten Doppelstränge in einem Bereich von etwa 100 bp bis über 1.000 bp. Die erwartete Länge des PCR-Produkts liegt hingegen bei etwa 80 bp, dies entspricht der Länge der Produkte aus den Kontrollreaktionen mit einer einzelnen Sequenz (K1 und K2). Die Produkte der Kontrollreaktionen wiesen keine Unregelmäßigkeiten auf, sodass Fehler beim Ansetzen der Reaktionen oder falsche Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden können.

Nebenprodukte ähnlicher Form wurden bereits bei der Verwendung einfacher Taq-DNA-Polymerasen beobachtet, konnten bisher aber durch den Einsatz der Platinium PFX DNA-Polymerase vermieden werden (siehe: *Amplifikation der Aptamerkandidaten* auf S. 58). Offenbar werden während der Selektion nun Aptamerkandidaten bevorzugt, die stark zur Bildung von Nebenprodukten neigen. Die Nebenprodukte entstehen dabei durch unerwünschte Hybridisierung verschiedener Aptamerkandidaten während der Annealingphase der PCR (siehe: *Effekte hoher Diversität* auf S. 21). Während der Amplifikation werden beinahe alle Aptamer-

kandidaten in Nebenprodukte umgewandelt, sodass die Selektion stark behindert wird. Für eine erfolgreiche Selektion von Aptameren muss die Bildung von Nebenprodukten unterbunden werden. Nachdem die Potenziale der unterschiedlichen Polymerasen ausgeschöpft scheinen, soll nun eine alternative Amplifikationstechnik in den SELEX-Prozess integriert werden.

### 3.2.4 Optimierung durch Einsatz der EmulsionsPCR

Zentrales Problem der aktuellen Selektion von Aptameren gegen die N-Domäne des ATP7B-Proteins ist die Entstehung von Nebenprodukten während der Amplifikation in der PCR durch unerwünschte Hybridisierung zwischen den Aptamerkandidaten. Die Hybridisierung von Aptamerkandidaten lässt sich auf verschiedene Weise vermindern. Beispielsweise kann die Gesamtmenge an Aptamerkandidaten begrenzt und so die Wahrscheinlichkeiten für die Hybridisierung minimiert werden. Dies kann entweder durch die Limitierung der Eingangsmenge der PCR oder durch die Limitierung der Anzahl an PCR-Zyklen erreicht werden. Eine limitierte Anzahl von PCR-Zyklen führt jedoch zu einer geringen Gesamtmenge an Aptamerkandidaten. Diese erlaubt lediglich niedrige Selektionsdrücke, der SELEX-Prozess würde viele Selektionsrunden benötigen und in dieser Zeit möglicherweise unterwandert werden oder auf andere Weise scheitern.

Die EmulsionsPCR findet seit einigen Jahren Anwendung bei der Erzeugung von *next generation sequencing* Bibliotheken, die ebenfalls zu einer Hybridisierung untereinander neigen. Während der EmulsionsPCR wird jedes Amplikon in ein eigenes Tröpfchen einer Emulsion eingeschlossen. So werden Interaktionen zwischen unterschiedlichen Amplikons verhindert. Die Protokolle zur Durchführung einer EmulsionsPCR sind im wesentlichen auf die Arbeit zweier Autoren zurückzuführen. So beschreibt Williams *et al.* den Einsatz einer hydrophoben Phase zur Emulsifikation einer PCR, die aus Mineralöl sowie den Detergenzien Triton-X-100 und Tween 80 besteht <sup>(87)</sup>. Demgegenüber schlägt Diehl *et al.* eine organische Phase aus dem artifiziellen, fettähnlichen Bis(2-ethylhexyl)carbonat mit Mineralöl und dem Emulgator ABIL WE 09 vor <sup>(88)</sup>. In den meisten Publikationen werden die



zeigt deutlich, dass BSA für eine erfolgreiche Amplifikation in der EmulsionsPCR benötigt wird.

Die Tröpfchengröße ist ein weiterer wichtiger Parameter der Emulsion. Die Tröpfchengröße ist ein inverses Maß für die Anzahl der erzeugten Kompartimente und hat gleichzeitig Einfluss auf die Stabilität der Emulsion. Ist die Tröpfchengröße zu Beginn der EmulsionsPCR zu groß, kommt es aufgrund von Flockung der einzelnen Tröpfchen zur Koaleszenz und damit zum Zusammenbruch der Emulsion. Ein Zusammenbruch der Emulsion ermöglicht in den verbleibenden PCR Zyklen die Bildung von Nebenprodukten und ist daher zu vermeiden. Die Tröpfchengröße sollte so gewählt werden, dass jeder Aptamerkandidat einzeln in ein Tröpfchen eingeschlossen wird. Gleichzeitig sollte die Anzahl der Kompartimente minimiert werden, da sonst die Reagenzien in den Kompartimenten im Verlauf der PCR schnell erschöpft sind während ein wachsender Anteil der Kompartimente leer bleibt. Hier muss also ein Kompromiss zwischen der benötigten Anzahl an Kompartimenten und der entstehenden Ausbeute gefunden werden. Die initiale Tröpfchengröße ist dabei im wesentlichen von der Viskosität der einzelnen Phasen sowie dem Emulsifikationsverfahren abhängig und kann in bestimmtem Maße über die Emulsifikationsparameter gesteuert werden.

So wurden für die Emulsifikationszeiten von 10, 30 und 60 Sekunden der Tröpfchendurchmesser ermittelt. Aufgrund der erwarteten hohen Größe von einigen Mikrometern konnte hier keines der klassischen Verfahren zur Größenbestimmung wie *dynamic light scattering* (DLS) oder *nanoparticle tracking analysis* (NTA) verwendet werden. Stattdessen wurden Aufnahmen der Emulsionen im Phasenkontrastmikroskop erzeugt und nachträglich digital analysiert (vgl. Abb. 3.2.8).

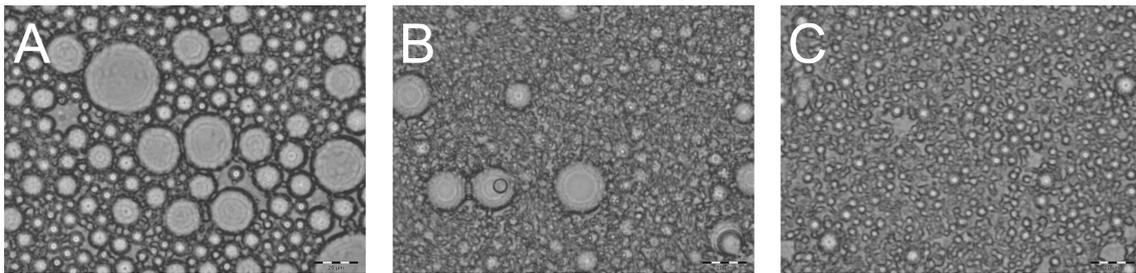


Abb. 3.2.8: Phasenkontrastmikrographen der Emulsion bei verschiedenen Emulsifikationsdauern für die EmulsionsPCR; Emulsifikationsdauer 10 Sekunden (A), 30 Sekunden (B) und 60 Sekunden (C); Maßstab 20 µm

Der mittlere Tröpfchendurchmesser liegt nach 10 Sekunden Emulsifikation bei etwa 8,8 µm, während viele Tröpfchen erheblich größer sind und teilweise Durchmesser von 40 µm erreichen. Im Vergleich zur Emulsion mit 10 Sekunden Emulsifikation ist die Emulsion mit 30 Sekunden insgesamt homogener. So sind die größten Tröpfchen nun etwa 30 µm groß, während der mittlere Durchmesser 6 µm ist. Dies entspricht etwa  $850 \cdot 10^8$  erzeugten Tröpfchen bei einem Gesamtvolumen von 100 µl. Mit der Emulsifikation von 60 Sekunden wurden dagegen etwa  $1,5 \cdot 10^9$  Tröpfchen erzeugt. Wiederum steigt die Homogenität der Tröpfchendurchmesser, während der mittlere Durchmesser nun bei etwa 5 µm liegt.

Nachfolgend soll die optimale Emulsifikationsdauer für die Erzeugung der maximalen Produktmenge bei gleichzeitiger Unterdrückung von Nebenprodukten ermittelt werden, dazu wurden Emulsionen mit Emulsifikationsdauern zwischen 5 und 60 Sekunden in einer PCR getestet (vgl. Abb. 3.2.9).

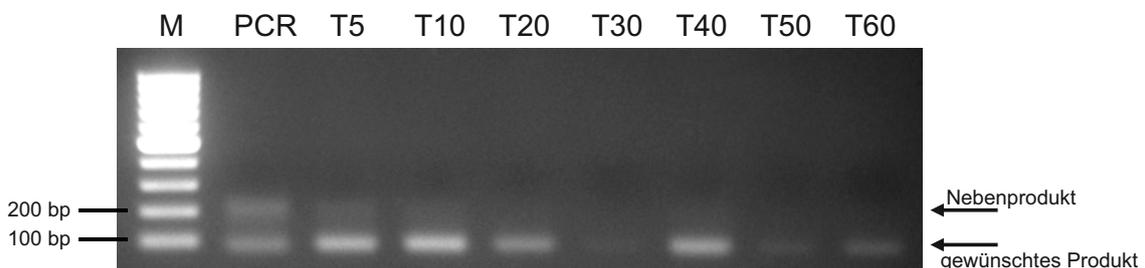


Abb. 3.2.9: Untersuchung des Einflusses der Emulsifikationsdauer (in Sekunden) auf die Produkt- und Nebenproduktbildung in der EmulsionsPCR; „konventionelle“ PCR im Vergleich (PCR); Marker (M; 100 bp DNA Marker); Agarose-Gel mit Roti Safe Gelstain

Die Emulsionen mit niedrigen Emulsifikationszeiten (5 bis 20 Sekunden) sind während der 20 PCR-Zyklen nicht stabil. Entsprechend hoch sind hier die Anteile an Nebenprodukten, die während der Reaktionen erzeugt werden. Stabile Emulsionen werden dagegen ab Emulsifikationsdauern von 30 Sekunden erzeugt, hier sind keine Nebenprodukte detektierbar. Entgegen dem Trend ist für die Reaktion mit 30 Sekunden Emulsifikationszeit in diesem speziellen Experiment kein Produkt detektierbar. Möglicherweise ist dies während der Isolation aus der organischen Phase versehentlich mit abgetrennt worden. Die EmulsionsPCR mit Emulsifikationsdauern von 40 Sekunden erzeugte die höchste Menge an Produkt. Bei höheren Emulsifikationsdauern fällt die Menge an Produkt durch den zunehmenden Anteil leerer Tröpfchen stetig ab, während in den kleineren Tröpfchen die Reagenzien gleichzeitig schneller erschöpft sind. Da die EmulsionsPCR zur Generierung einer möglichst großen Menge an Aptamerkandidaten eingesetzt werden soll, wurde die optimale Emulsifikationsdauer auf 40 Sekunden festgelegt. So wird die Bildung von Nebenprodukten durch den Einsatz der EmulsionsPCR unterdrückt.

Abschließend wurde die Eingangskonzentration untersucht, ab der es auch in der EmulsionsPCR zur Bildung von Nebenprodukten kommt. Dazu wurde die Eingangskonzentration der Aptamerkandidaten in der wässrigen Phase der EmulsionsPCR zwischen 20 pM und 2  $\mu$ M variiert (vgl. Abb. 3.2.10). Als Vergleichsmöglichkeit wurde eine konventionelle PCR mit den selben Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel analysiert und die Anteile des Produkts und der Nebenprodukte wurden densitometrisch bestimmt.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

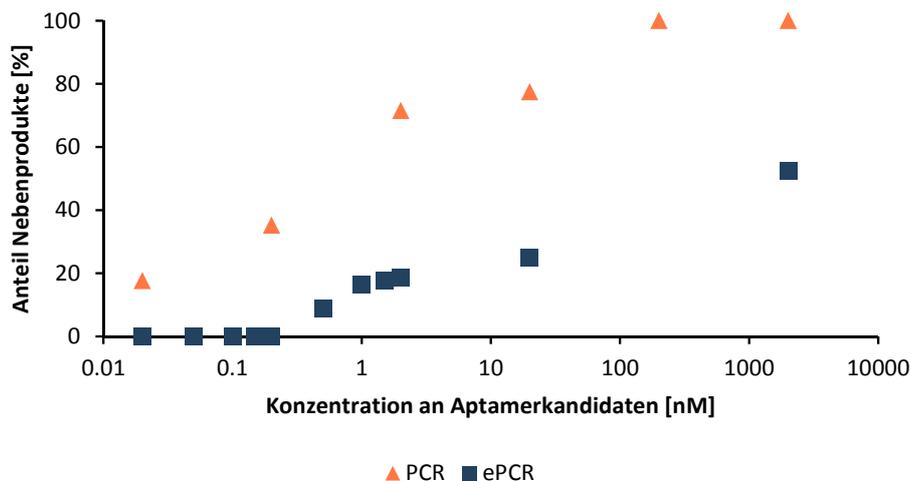


Abb. 3.2.10: Entstehung von Nebenprodukten in der EmulsionsPCR in Abhängigkeit der Eingangskonzentration (ePCR); „konventionelle“ PCR im Vergleich (PCR)

In der konventionellen PCR werden bereits bei der kleinsten verwendeten Eingangskonzentration von 0,02 pM Nebenprodukte gebildet. Der Anteil der Nebenprodukte steigt mit zunehmender Eingangsmenge stetig und erreicht bei einer Startkonzentration von 200 nM 100 %. Auch in der EmulsionsPCR steigt der Anteil der Nebenprodukte im PCR-Produkt stetig, jedoch in geringerem Maße. So beträgt der Anteil korrekt amplifizierter Aptamerkandidaten selbst bei der höchsten getesteten Startkonzentration von 2  $\mu$ M nur etwa 50 %. Unter einer Startkonzentration von 500 pM sind in der EmulsionsPCR hingegen keine Nebenprodukte nachweisbar. Somit liegt die höchste tolerierte Startkonzentration für eine EmulsionsPCR ohne Bildung von Nebenprodukten bei etwa 200 pM. Die Einhaltung dieser Obergrenze ist zur Unterdrückung von Nebenprodukten im SELEX-Prozess wesentlich und sollte entsprechend kontrolliert werden.

Zu einer vollständigen Integration der EmulsionsPCR in den SELEX-Prozess gehört auch eine entsprechend funktionale Isolation der amplifizierten Aptamerkandidaten aus der Emulsion. Für die hier verwendeten Emulsionen auf Basis von Bis(2-ethylhexyl)carbonat wurde in der Literatur bereits ein wirkungsvolles und einfaches Protokoll vorgestellt <sup>(90)</sup>. Anstelle des konventionellen Prinzips mehrfacher Extraktionen der organischen Phase wird hier die Emulsion durch Zugabe

von Isobutanol aufgebrochen. Nach der Zugabe von Bindepuffer konnten die Amplifikate dann direkt aus dem Gemisch über ein kommerzielles Silikamembran-Kit aufgereinigt werden. Im SELEX-Prozess sollten die so amplifizierte Aptamerkandidaten abschließend quantifiziert und auf eventuell vorhandene Nebenprodukte geprüft werden. So stellt die EmulsionsPCR ein wertvolles Werkzeug zur einfachen, nebenproduktfreien Amplifikation von Aptamerkandidaten dar und sollte routinemäßig im SELEX-Prozess angewendet werden.

### 3.2.5 Anpassung der Analytik zur Überwachung der SELEX

Die Entstehung von Nebenprodukten in der PCR hat auch Auswirkungen auf die Analytik, die zur Überwachung des SELEX-Prozesses eingesetzt wird. Zentrales Instrument zur Bestimmung der Konzentration der Aptamerkandidaten ist die Real Time PCR. Hier wird das Erreichen eines Grenzwertes der Fluoreszenz genutzt um daraus die initiale DNA-Konzentration in der Probe in Relation zu einer Kalibriergeraden abzuleiten. Dafür werden Farbstoffe genutzt, die in den DNA-Doppelstrang interkalieren und anschließend zur Fluoreszenz fähig sind. Dabei ist die Fluoreszenz, die von dem jeweiligen DNA-Doppelstrang emittiert werden kann, direkt von dessen Länge abhängig. Die längeren DNA-Doppelstränge der Nebenprodukte erzeugen also ein größeres Fluoreszenzsignal und erreichen den Grenzwert so früher. Die gemessene Konzentration ist daher größer als die reale Konzentration in der Probe. Andererseits führen Heteroduplexe zu niedrigeren Signalen.

Auch einige andere Verfahren zur Konzentrationsbestimmung wie der direkte Einsatz von einzel- oder doppelstrangsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen werden auf die selbe Art gestört und überbewerten die Konzentration in der Probe. Der Effekt kann nicht durch die Auswahl einer anderen Kalibriersubstanz ausgeglichen werden, da die Nebenprodukte in der PCR ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Nebenprodukten darstellen, das je nach Selektions- und PCR-Bedingungen, Schwankungen unterliegt und sich über den Verlauf der SELEX von Runde zu Runde ändert.

## Experimente zur Selektion von Aptameren

Alternativ zu einer nachträglichen Derivatisierung zur Detektion können die Aptamerkandidaten auch direkt markiert werden. Ähnlich zu der Biotinylierung des *antisense*-Stranges bietet der Einsatz eines fluoreszenzmodifizierten *sense*-Primers eine elegante Möglichkeit die Aptamerkandidaten während der Amplifikation zu markieren (vgl. Abb. 3.2.11). Da hier jeder Aptamerkandidat ausgehend vom *sense*-Primer aus aufgebaut wird, werden so alle Aptamerkandidaten mit der entsprechenden Modifikation erzeugt. Dabei ist die Fluoreszenz von der jeweiligen Länge des Analyten unabhängig, da lediglich die erste Position der DNA-Kette markiert ist.

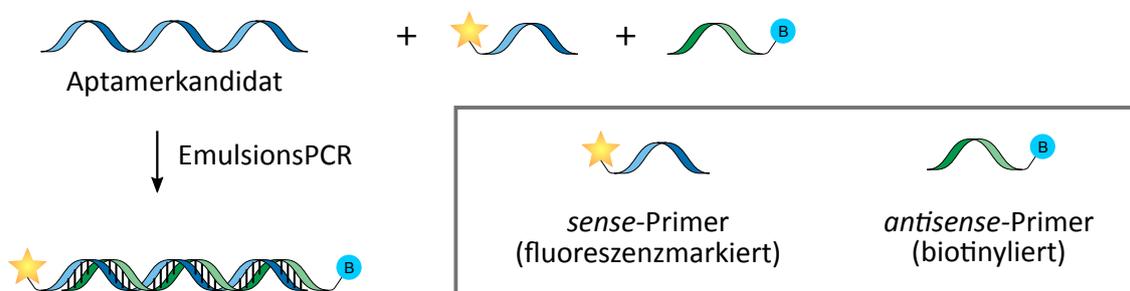


Abb. 3.2.11: Funktionalisierung während der EmulsionsPCR: Fluoreszenzmarkierung der Aptamerkandidaten; Biotinylierung der *antisense*-Stränge

Der Standard-Fluoreszenzfarbstoff Cy5 wurde zur Markierung des *sense*-Primers eingesetzt, um eine einfache Detektion mit verschiedenen Geräten zu ermöglichen. Vor dem Einsatz im SELEX-Prozess musste jedoch die Beständigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes gegen die zu erwartenden Einflüsse getestet werden. So wurde etwa getestet ob die Temperaturzyklen der PCR die Fluoreszenz des Farbstoffes beeinflussen oder wie sich die Fluoreszenz unter verschiedenen Pufferbedingungen entwickelt. Insgesamt liegen die Änderungen in der Fluoreszenz dabei meist im kleinen prozentualen Bereich ( $\leq 5\%$ ). Auch hydrophobe Substanzen, wie die organische Phase der EmulsionsPCR oder hydrophobe Lösemittel, beeinflussen die Fluoreszenz nur geringfügig. Die Fluoreszenz der Cy5 modifizierten *sense*-Primer ist also unter den zu erwartenden Reaktionsbedingungen stabil.

Zusätzlich wurde getestet, ob etwaige unreaktierte Primer während der Aufrei-

nigung von den Aptamerkandidaten abgetrennt werden können, da diese sonst die Konzentrationsmessung stören würden. Dazu wurde jeweils eine unreaktierte PCR-Mixtur und ein entsprechendes PCR-Produkt nach Brechen der Emulsion mit Isobutanol über ein kommerzielles Silikamembran-Kit aufgereinigt. Nach Abschluss der Aufreinigung sind lediglich minimale Spuren der unreaktierten Primer messbar, während das PCR-Produkt eine starke Fluoreszenz aufweist. Neben der bestätigten prinzipiellen Eignung der Fluoreszenzmarkierung spielen zusätzlich die Instrumente zur Bestimmung der Fluoreszenz eine entscheidende Rolle. Aufgrund der Kontaminationsgefahr sollte die Probe nach der Messung nicht mehr in den SELEX-Prozess eingehen. So ist die Entnahme einer möglichst kleinen Probe wünschenswert. Dies kann durch die Verwendung eines Mikrovolumen-Fluoreszenzspektrometers wie dem NanoDrop 3300 gewährleistet werden. Für eine Messung werden lediglich 2 µl Probe benötigt, während ein breiter Konzentrationsbereich von 200 pM bis 1 µM abgedeckt wird. Aufgrund dieser relativ hohen unteren Konzentrationsgrenze ist die Analyse von Proben mit extrem niedriger Aptamerkonzentration, wie dem Eluat nach Inkubation mit den Zielmolekülen, in der Real Time PCR alternativlos. Für alle anderen Proben jedoch wird, auch wegen der überlegenen Zeit- und Kosteneffizienz, die fluorimetrische Bestimmung der Konzentration an Aptamerkandidaten angestrebt. So können insbesondere die Real Time PCRs zur Bestimmung der Amplifikatmenge nach der PCR durch die einfache Messung der Fluoreszenz ersetzt werden, sodass der SELEX-Prozess weitgehend ohne Real Time PCR durchgeführt werden kann.

### 3.3 Optimierter SELEX-Prozess

Nach der erfolgreichen Integration der EmulsionsPCR in den SELEX-Prozess soll der optimierte SELEX-Prozess eingesetzt werden um Aptamere gegen die immobilisierte N-Domäne des ATP7B zu selektieren. Analog zu den bisherigen Selektionen werden in der ersten Selektionsrunde 1000 pmol Aptamerkandidaten und 100 pmol immobilisierte N-Domäne auf Chitin-Magnetpartikeln eingesetzt. Nach

der Konditionierung der Bindungspartner im SELEX-Puffer erfolgt die Inkubation der Aptamerkandidaten mit den immobilisierten Zielmolekülen für 30 Minuten. In drei Waschschrritten werden ungebundene Aptamerkandidaten aus der SELEX entfernt. Die Komplexe der verbliebenen Aptamerkandidaten mit ihren Zielmolekülen werden durch Erhitzen auf 95 °C aufgebrochen, die freiwerdenden Aptamerkandidaten mit dem Überstand über den Magnetpartikeln entnommen und anschließend in der EmulsionsPCR amplifiziert. Dabei wird durch den Einsatz des Cy5-markierten *sense*-Primers jeder Aptamerkandidat als entsprechend markiertes Derivat amplifiziert, während die *antisense*-Stränge von einem biotinylierten Primer aus aufgebaut werden. Nach der ersten EmulsionsPCR werden die Aptamerkandidaten mit ihrem *antisense*-Strang aus der Emulsion isoliert, die Konzentration durch Messung der Fluoreszenz bestimmt und das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese auf Nebenprodukte geprüft. Danach gehen die zuvor amplifizierten Aptamerkandidaten in eine weitere EmulsionsPCR ein, in der die Startmenge für die nächste Selektionsrunde generiert wird. Wiederum werden die doppelsträngigen Aptamerkandidaten isoliert und analysiert. Anschließend erfolgt die Abtrennung der biotinylierten *antisense*-Stränge von den Aptamerkandidaten nach Bindung an Streptavidin-Magnetpartikel durch Einsatz von 100 mM Natronlauge. Abschließend wird der Überstand, in dem sich nun die freien Aptamerkandidaten befinden, neutralisiert und die Aptamerkandidaten stehen nach einer Rekonditionierung für die nächste Selektionsrunde bereit.

### **Überprüfung der Anwendbarkeit der optimierten SELEX**

Nach diesem Schema wurde eine neue Selektion gegen die N-Domäne des ATP7B begonnen. Dabei wurde beschlossen, die Selektion neu zu starten, damit keine eventuellen Nebenprodukte aus der vorherigen Selektion in diese Selektion eingehen würden. Wegen der begrenzten Zeit wurden lediglich 5 Selektionsrunden durchgeführt. Während der Durchführung wurde festgestellt, dass die Optimierungen die SELEX wesentlich beschleunigen (vgl. Tab. 3.3.1).

Tab. 3.3.1: Zeitersparnis in einer Selektionsrunde in der optimierten SELEX gegenüber der konventionellen SELEX

<b>Konventionelle SELEX</b>		<b>Optimierte SELEX</b>	
Vorbereitung	15 min	Vorbereitung	15 min
Selektion	1 h	Selektion	1 h
1. PCR	1:45 h	1. ePCR + Aufreinigung	1:55 h
2. PCR	3 h	2. ePCR + Aufreinigung	1:55 h
Agarose GE	1 h	Agarose GE	1 h
Strangtrennung	20 min	Strangtrennung	20 min
Real Time PCR	6 h	Fluoreszenzmessungen	10 min
<b>Summe</b>	<b>13:20 h</b>	<b>Summe</b>	<b>6:35 h</b>
		Real Time PCR [optional]	3 h

Die Vorbereitungen zur Selektion und der Selektionsschritt wurden nicht verändert. Die Inkubationszeiten in der EmulsionsPCR konnten im Vergleich zur „regulären“ PCR jedoch stark verkürzt werden, da hier das Annealing der Primer nicht mehr mit der Fehlhybridisierung an andere Aptamerkandidaten im Wettbewerb steht. So kann im Vergleich zur zweiten regulären PCR durch die EmulsionsPCR etwa 1 h eingespart werden. Eine weitere Zeitersparnis stellt der Einsatz der Fluoreszenzmessung zur Konzentrationsbestimmung der Aptamerkandidaten dar. Diese Messungen benötigen mit der Kalibration des Fluorometers jeweils nur wenige Minuten. Zusätzlich können teilweise auch die Reagenzien eingespart werden, da die Real Time PCR nun nicht mehr routinemäßig eingesetzt werden muss.

Neben der Zeitersparnis konnte innerhalb dieser fünf Selektionsrunden insbesondere die Entstehung von Nebenprodukten während der Amplifikation durch den Einsatz der EmulsionsPCRs erfolgreich unterdrückt werden, obwohl diese in der Selektion ohne EmulsionsPCR bereits in der dritten Selektionsrunde auftraten. Dies bestätigt die erfolgreiche Optimierung der EmulsionsPCR und deren Integration in die SELEX. Damit konnten einige kritische Fehlerquellen der SELEX eliminiert und so die Erfolgchance für die Selektion von Aptameren insgesamt gesteigert werden.

### 4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte die Selektion von Aptameren optimiert werden. Zentral für diese Optimierung ist die Integration einer begleitenden Analytik, die eine direkte Kontrolle und proaktive Führung der SELEX erlaubt.

Als wichtigstes Werkzeug wurde hier die Real Time PCR adaptiert, mit der die Konzentration an Aptamerkandidaten in einer Probe ermittelt werden kann. Für die Anwendung der Real Time PCR mussten zunächst deren Parameter optimiert werden. So wurden sowohl die Annealingtemperatur als auch die Primerkonzentration angepasst und entsprechende Referenzsubstanzen für die Real Time PCR ausgewählt. Durch Einfügen von randomisierten Positionen innerhalb der Referenzsubstanzen wurden zudem Diversitätsstandards geschaffen. Im Vergleich mit diesen Standards kann so das Maß an Diversität innerhalb der Probe bestimmt werden. Aufgrund des stetigen Ausschlusses nieder-affiner Aptamerkandidaten, ist die Abnahme der Diversität ein Maß für den Fortschritt der Selektion. Im späteren Verlauf wurde zudem ein Selektionsschritt mit einem bereits bekanntem Aptamer (6H7) in einer Konkurrenzsituation mit anderen Aptamerkandidaten simuliert. Durch den Einsatz einer spezifischen Sonde konnte hier ein Assay entwickelt werden, mit dem die Konzentration des 6H7-Aptamers in einer komplexen Probe aus Aptamerkandidaten direkt mit der Real Time PCR ermittelt werden kann.

Für die Untersuchung, ob die gewählte Analytik für die SELEX geeignet ist, wurde eine „minimale“ SELEX aufgestellt. Dabei wurden lediglich die absolut notwendigen Schritte integriert. Als Zielmolekül dieser Modell-Selektion wurde der His-Tag ausgewählt, der in der Bioprozesstechnik breite Anwendung findet. Für diesen Prozess wurden die His-Tag-Proteine auf Magnetpartikeln immobilisiert, dies ermöglicht scharf definierte Inkubationszeiten und die einfache Entnahme einer gewünschten Menge an immobilisierten Zielmolekülen. Zu niedrige oder zu hohe Immobilisierungsdichten können die SELEX nachteilig beeinflussen und sollten deshalb vermieden werden. Für den Modell-Prozess wurde daher die maximale

Immobilisierungsdichte der Magnetpartikel bestimmt und anschließend eine mittlere Immobilisierungsdichte eingesetzt (6,0 µg Protein pro mg Magnetpartikel). Mit diesen immobilisierten His-Tag-Proteinen wurde anschließend die Effektivität des Selektionsschrittes untersucht. Dazu wurde das Aptamer 6H7 eingesetzt, welches gegen den His-Tag gerichtet ist. In diesem Selektionsschritt konnte gezeigt werden, dass das 6H7-Aptamer an sein Zielmolekül gebunden hat und nach den Waschschritten eluiert wurde. Dabei wurde das 6H7-Aptamer selektiv aus einem 1:1 Gemisch mit nicht-affinen Sequenzen isoliert. Zusätzlich wurde ein Selektionsschritt in einem automatisierten Magnetpartikelprozessor durchgeführt, dessen Ergebnisse äquivalent zur manuellen Selektion sind. Die Funktionalität des Selektionsschrittes und dessen Automatisierung konnten also erfolgreich demonstriert werden. Zusätzlich konnte die Eignung der Real Time PCR zur Überwachung der Selektion bestätigt werden.

Während der Erprobung der Amplifikation von Aptamerkandidaten traten unerwartete Nebenprodukte auf. So wurden bei Verwendung einer Standard-Taq-Polymerase Nebenprodukte der Größe von etwa 120 nt nachgewiesen, obwohl die Aptamerkandidaten lediglich 78 nt groß sind. Das Auftreten der Nebenprodukte stellt ein signifikantes Hindernis für eine erfolgreiche Selektion dar, da beinahe 50 % der Aptamerkandidaten in Nebenprodukte umgewandelt wurden. Durch Auswahl der Platinum PFX Polymerase konnte die Entstehung solcher Nebenprodukte verhindert werden.

Für eine Selektion müssen die Aptamerkandidaten einzelsträngig vorliegen. Zu deren Produktion wurde ihre direkte Amplifikation in einer asymmetrischen PCR etabliert. Die Integration der asymmetrischen PCR in die SELEX wurde jedoch wegen der aufwendigen Nachbearbeitung des PCR-Produkts verworfen. Stattdessen wurde die Isolation einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus regulären PCR-Produkten realisiert. Dazu werden die Aptamerkandidaten mit einem biotinylierten *antisense* Primer amplifiziert, sodass die Komplexe der komplementären Stränge nach der PCR an immobilisiertes Streptavidin binden können. Aus den immobi-

lisierten Komplexen können dann die Aptamerkandidaten selektiv freigesetzt werden, während die *antisense* Stränge weiter immobilisiert bleiben. Dabei wurde festgestellt, dass die Stabilität der Streptavidin Bindung/Immobilisierung kritisch ist und zwischen den kommerziellen Anbietern schwankt. Für die letztendlich im Prozess eingesetzten Magnetpartikel konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die erzeugten einzelsträngigen Aptamerkandidaten frei von Verunreinigung durch Streptavidin oder komplementäre Stränge sind.

Nach Abschluss der Optimierung der Einzelschritte wurde die minimale SELEX eingesetzt, um eine *de novo* Selektion gegen den His-Tag durchzuführen. Dabei wurde über die insgesamt neun Selektionsrunden eine deutliche Verminderung in der Diversität der angereicherten Teil-Bibliothek an Aptamerkandidaten nachgewiesen. Dies ist der indirekte Nachweis für eine erfolgte Selektion.

Im Anschluss an die erfolgreiche Aufstellung und Erprobung der minimalen SELEX wurde diese zur Selektion von Aptameren gegen das Wilson-Protein (ATP7B) eingesetzt. Die Selektion scheiterte jedoch in der dritten Runde durch das wiederholte Auftreten von Nebenprodukten während der Amplifikation der Aptamerkandidaten. Dabei wurden hier alle Aptamerkandidaten in Nebenprodukte umgesetzt. Ursache für die Bildung dieser Nebenprodukte ist die partielle Hybridisierung zweier Aptamerkandidaten in der Annealingphase der PCR, die durch die hohe Diversität in der Probe ermöglicht wird. Diese Hybridisierung kann durch Kompartimentierung des Reaktionsraums in der PCR verhindert werden. Dazu wurde die EmulsionsPCR eingesetzt, deren Parameter vor der Integration in die SELEX optimiert wurden. So wurden die Art der organischen Phase, die Zusammensetzung der wässrigen PCR-Phase und die Emulsifikationsdauer optimiert. Auch die maximale Eingangskonzentration von Aptamerkandidaten wurde bestimmt, unter der es nicht zur Bildung von Nebenprodukten kommt. Zusätzlich wurde aus der Literatur ein vereinfachtes Protokoll zur Isolierung der Amplifikate aus der Emulsion adaptiert, sodass die EmulsionsPCR vollständig in die SELEX integriert werden konnte. In einer erneuten Selektion gegen das Wilson-Protein konnte gezeigt werden, dass

der Einsatz der EmulsionsPCR die Entstehung von Nebenprodukten erfolgreich unterdrückt. Dies ist für die Erfolgsaussicht der SELEX elementar, da die Selektion andernfalls signifikant behindert werden würde. Zusätzlich wurde eine fluoreszenz-markierte Markierung der Aptamerkandidaten eingeführt, welche die Quantifizierung der Aptamerkandidaten wesentlich vereinfacht. So konnte die SELEX ohne die steti-ge Überwachung durch die Real Time PCR geführt werden. Der Zeitbedarf sank daher von 13:20 Stunden auf nur etwa 6:45 Stunden pro Selektionsrunde, dies entspricht einer Einsparung von etwa 50 %.

Ziel der Arbeit war die Optimierung der Aptamerselektion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine minimale SELEX entworfen und optimiert. Ein wiederkehrendes Problem der minimalen SELEX ist die Entstehung von Nebenprodukten während der Amplifikation der Aptamerkandidaten. Erst durch Integration der Emulsions-PCR konnte die Bildung von Nebenprodukten nachhaltig unterdrückt werden. Die zweite zentrale Verbesserung der minimalen SELEX ist die Einführung einer Analytik zur stetigen Überwachung der SELEX. Die Analytik ermöglicht neben der Überprüfung der grundlegenden Prozessschritte auch Einblicke in den angelegten Selektionsdruck und den Fortschritt der Selektion. Die engmaschige Überwachung erlaubt aber auch die proaktive Führung der SELEX, so steigen auch die Erfolgsaussichten der Selektion.

### **Ausblick**

Auf die optimierte SELEX aufbauend kann nun die eigentliche Selektion von Aptameren erfolgen. Neben den gezeigten *positiv* Selektionsschritten gegen Zielmoleküle sollten diese Selektionen auch Gegenselektionsschritte enthalten, beispielsweise gegen die Hintergrundmatrix der Magnetpartikel oder Moleküle, die dem Zielmolekül ähnliche sind. Diese Counterselektionen sind dabei Variationen des hier beschriebenen *positiv* Selektionsschrittes und daher ohne größeren Aufwand durchführbar.

Zusätzlich können die angereicherten Teil-Bibliotheken aus verschiedenen Selektionsrunden in *next generation sequencing* Verfahren untersucht werden (NGS). Die

## Zusammenfassung und Ausblick

---

massiv parallele Sequenzierung der Aptamerkandidaten gibt eine vollständigere Übersicht über die vorhandenen Aptamerkandidaten und erlaubt es auch die Häufigkeit verschiedener Sequenzmotive zu erfassen. Im Vergleich zur Real Time PCR ist NGS zeit- und kostenintensiver, ermöglicht jedoch auch eine genauere Analyse der Diversität und direkte quantitative Einblicke in den Selektionsprozess und das Verhalten individueller Sequenzmotive.

## Abkürzungsverzeichnis

BSTE	<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase
cDNA	komplementäre DNA
CE	Kapillarelektrophorese
Cq	<i>quantification cycle</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
LC	Flüssigchromatographie
LIC	Ligase independent cloning
MS	Massenspektrometrie
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFEI	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I
pNBE	<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase
RFU	relative Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment</i>
SQ	Ausgangsmenge
ssDNA	einzelsträngige DNA
SubE	<i>Bacillus subtilis</i> Esterase

### Literatur

- (1) Walter, J.-G., Stahl, F., und Scheper, T., (2012). Aptamers as affinity ligands for downstream processing. *Engineering in Life Sciences* 12, 496–506 (siehe S. 2).
- (2) Schax, E., Lönne, M., Scheper, T., Belkin, S., und Walter, J.-G., (2015). Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20, 1016–1025 (siehe S. 2).
- (3) Lübbecke, M., Walter, J.-G., Stahl, F., und Scheper, T., (2012). Aptamers as detection molecules on reverse phase protein microarrays for the analysis of cell lysates. *Engineering in Life Sciences* 12, 144–151 (siehe S. 2).
- (4) Meyer, M., Scheper, T., und Walter, J.-G., (2013). Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7097–7109 (siehe S. 2).
- (5) Schüling, T., Eilers, A., Scheper, T., und Walter, J., (2018). Aptamer-based lateral flow assays. *AIMS Bioengineering* 5, 78–102 (siehe S. 2).
- (6) Reinecke, T., Walter, J.-G., Kobelt, T., Ahrens, A., Scheper, T., und Zimmermann, S., (2018). Design and evaluation of split-ring resonators for aptamer-based biosensors. *Journal of Sensors and Sensor Systems* 7, 101–111 (siehe S. 2).
- (7) Seleci, D. A., Seleci, M., Jochums, A., Walter, J.-G., Stahl, F., und Scheper, T., (2016). Aptamer mediated niosomal drug delivery. *RSC Advances* 6, 87910–87918 (siehe S. 2).
- (8) Dupont, D. M., Larsen, N., Jensen, J. K., Andreasen, P. A., und Kjems, J., (2015). Characterisation of aptamer-target interactions by branched selection and high-throughput sequencing of SELEX pools. *Nucleic Acids Research* 43, DOI: 10.1093/nar/gkv700 (siehe S. 3, 27).
- (9) Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., und Ruml, T., (2015). Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances* 33, 1141–1161 (siehe S. 6, 8, 19).

- (10) Rohloff, J. C., Gelinas, A. D., Jarvis, T. C., Ochsner, U. A., Schneider, D. J., Gold, L., und Janjic, N., (2014). Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3, e201 (siehe S. 6, 9–11).
- (11) McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P., und Linn, C. P., (1995). The nucleic acid ligand. A new tool for molecular recognition. *Analytical Chemistry* 67, 663A–668A (siehe S. 6).
- (12) Kim, Y. S., und Gu, M. B., in *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol 140*; Springer, Berlin, Heidelberg: 2014; Bd. 140, S. 29–67 (siehe S. 7, 8, 10–13, 25).
- (13) Ozer, A., Pagano, J. M., und Lis, J. T., (2014). New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3, 1–18 (siehe S. 7, 11, 12, 14, 19, 25, 27).
- (14) Legiewicz, M., Lozupone, C., Knight, R., und Yarus, M., (2005). Size, constant sequences, and optimal selection. *RNA* 11, 1701–1709 (siehe S. 7, 8).
- (15) Jijakli, K., Khraiwesh, B., Fu, W., Luo, L., Alzahmi, A., Koussa, J., Chaiboonchoe, A., Kirmizialtin, S., Yen, L., und Salehi-Ashtiani, K., (2016). The in vitro selection world. *Methods* 106, 3–13 (siehe S. 7).
- (16) Gold, L., Janjic, N., Jarvis, T., Schneider, D., Walker, J. J., Wilcox, S. K., und Zichi, D., (2012). Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, 1–9 (siehe S. 7, 11).
- (17) Blind, M., und Blank, M., (2015). Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4, e223 (siehe S. 7–9, 13, 21, 27).
- (18) Kulbachinskiy, A. V., (2007). Methods for selection of aptamers to protein targets. *Biochemistry (Moscow)* 72, 1505–1518 (siehe S. 8, 10).

- (19) Sharma, T. K., Bruno, J. G., und Dhiman, A., (2017). ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnology Advances* 35, 275–301 (siehe S. 8, 16).
- (20) Klug, S. J., und Famulok, M., (1994). All you wanted to know about SELEX. *Molecular Biology Reports* 20, 97–107 (siehe S. 8).
- (21) Pan, W., Xin, P., und Clawson, G. A., (2008). Minimal primer and primer-free SELEX protocols for selection of aptamers from random DNA libraries. *BioTechniques* 44, 351–360 (siehe S. 8).
- (22) Ouellet, E., Foley, J. H., Conway, E. M., und Haynes, C., (2015). Hi-Fi SELEX: A high-fidelity digital-PCR based therapeutic aptamer discovery platform. *Biotechnology and Bioengineering* 112, 1506–1522 (siehe S. 8, 17, 25, 26, 28).
- (23) Diafa, S., und Hollenstein, M., (2015). Generation of aptamers with an expanded chemical repertoire. *Molecules* 20, 16643–16671 (siehe S. 9, 20).
- (24) Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K. I., Yokoyama, S., und Hirao, I., (2013). Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nature Biotechnology* 31, 453–457 (siehe S. 9).
- (25) Tolle, F., und Mayer, G., (2013). Dressed for success – applying chemistry to modulate aptamer functionality. *Chem. Sci.* 4, 60–67 (siehe S. 9).
- (26) Anosova, I., Kowal, E. A., Dunn, M. R., Chaput, J. C., Van Horn, W. D., und Egli, M., (2016). The structural diversity of artificial genetic polymers. *Nucleic Acids Research* 44, 1007–1021 (siehe S. 9).
- (27) Ochsner, U. A., Green, L. S., Gold, L., und Janjic, N., (2014). Systematic selection of modified aptamer pairs for diagnostic sandwich assays. *BioTechniques* 56, 125–133 (siehe S. 9, 14, 28).
- (28) Stoltenburg, R., Reinemann, C., und Strehlitz, B., (2007). SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24, 381–403 (siehe S. 9, 10, 20).

- (29) Stoltenburg, R., Nikolaus, N., und Strehlitz, B., (2012). Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2012, 1–14 (siehe S. 10, 13).
- (30) Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., und Zhang, B., (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2142 (siehe S. 10, 27).
- (31) Baaske, P., Wienken, C. J., Reineck, P., Duhr, S., und Braun, D., (2010). Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 2238–2241 (siehe S. 10, 28).
- (32) Förster, U., Weigand, J. E., Trojanowski, P., Suess, B., und Wachtveitl, J., (2011). Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Research* 40, 1807–1817 (siehe S. 10).
- (33) Ahmad, K. M., Oh, S. S., Kim, S., McClellan, F. M., Xiao, Y., und Soh, H. T., (2011). Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. *PLoS ONE* 6, DOI: 10.1371/journal.pone.0027051 (siehe S. 10, 12).
- (34) Yufa, R., Krylova, S. M., Bruce, C., Bagg, E. A., Schofield, C. J., und Krylov, S. N., (2015). Emulsion PCR Significantly Improves Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures-Based Aptamer Selection: Allowing for Efficient and Rapid Selection of Aptamer to Unmodified ABH2 Protein. *Analytical Chemistry* 87, 1411–1419 (siehe S. 11).
- (35) Mallikaratchy, P., (2017). Evolution of Complex Target SELEX to Identify Aptamers against Mammalian Cell-Surface Antigens. *Molecules* 22, 215 (siehe S. 11).
- (36) McKeague, M., und DeRosa, M. C., (2012). Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids* 2012, 1–20 (siehe S. 11, 13, 28).

- (37) 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* 107, 15373–15378 (siehe S. 12, 27).
- (38) Oh, S. S., Ahmad, K. M., Cho, M., Kim, S., Xiao, Y., und Soh, H. T., (2011). Improving Aptamer Selection Efficiency through Volume Dilution, Magnetic Concentration, and Continuous Washing in Microfluidic Channels. *Analytical Chemistry* 83, 6883–6889 (siehe S. 12).
- (39) Kim, J., Hilton, J. P., Yang, K.-A., Pei, R., Stojanovic, M., und Lin, Q., (2013). Nucleic acid isolation and enrichment on a microchip. *Sensors and Actuators A: Physical* 195, 183–190 (siehe S. 12).
- (40) Vanbrabant, J., Leirs, K., Vanschoenbeek, K., Lammertyn, J., und Michiels, L., (2014). reMelting curve analysis as a tool for enrichment monitoring in the SELEX process. *The Analyst* 139, 589–595 (siehe S. 12, 21, 26).
- (41) Yang, J., und Bowser, M. T., (2013). Capillary Electrophoresis–SELEX Selection of Catalytic DNA Aptamers for a Small-Molecule Porphyrin Target. *Analytical Chemistry* 85, 1525–1530 (siehe S. 12).
- (42) Drabovich, A. P., Berezovski, M., Okhonin, V., und Krylov, S. N., (2006). Selection of Smart Aptamers by Methods of Kinetic Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* 78, 3171–3178 (siehe S. 13, 18, 19).
- (43) Hamula, C. L. a., Guthrie, J. W., Zhang, H., Li, X.-F., und Le, X. C., (2006). Selection and analytical applications of aptamers. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 681–691 (siehe S. 13, 14).
- (44) Nikolaus, N., und Strehnitz, B., (2014). DNA-Aptamers Binding Aminoglycoside Antibiotics. *Sensors* 14, 3737–3755 (siehe S. 13).
- (45) Qu, H., Csordas, A. T., Wang, J., Oh, S. S., Eisenstein, M. S., und Soh, H. T., (2016). Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions. *ACS Nano* 10, 7558–7565 (siehe S. 13).

- (46) Nguyen, V.-T., Kwon, Y. S., Kim, J. H., und Gu, M. B., (2014). Multiple GO-SELEX for efficient screening of flexible aptamers. *Chem. Commun.* 50, 10513–10516 (siehe S. 13).
- (47) Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'Donoghue, M. B., und Tan, W., (2010). Development of DNA aptamers using cell-selex. *Nature Protocols* 5, 1169–1185 (siehe S. 14).
- (48) Chen, C., Zhou, S., Cai, Y., und Tang, F., (2017). Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology. *npj Precision Oncology* 1, 37 (siehe S. 14, 17).
- (49) Ahmad, K. M., Xiao, Y., und Tom Soh, H., (2012). Selection is more intelligent than design: Improving the affinity of a bivalent ligand through directed evolution. *Nucleic Acids Research* 40, 11777–11783 (siehe S. 14).
- (50) Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K., Rowat, A. C., Baret, J.-C., Marquez, M., Klibanov, A. M., Griffiths, A. D., und Weitz, D. A., (2010). Ultra-high-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 4004–4009 (siehe S. 14).
- (51) Oh, S. S., Plakos, K., Lou, X., Xiao, Y., und Soh, H. T., (2010). In vitro selection of structure-switching, self-reporting aptamers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14053–14058 (siehe S. 14).
- (52) Marimuthu, C., Tang, T.-H., Tominaga, J., Tan, S.-C., und Gopinath, S. C. B., (2012). Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *The Analyst* 137, 1307 (siehe S. 15–17, 27, 53).
- (53) Damase, T. R., Ellington, A. D., und Allen, P. B., (2017). Purification of single-stranded DNA by co-polymerization with acrylamide and electrophoresis. *BioTechniques* 62, 275–282 (siehe S. 15–17).
- (54) Avci-Adali, M., Paul, A., Wilhelm, N., Ziemer, G., und Wendel, H. P., (2009). Upgrading SELEX Technology by Using Lambda Exonuclease Digestion for Single-Stranded DNA Generation. *Molecules* 15, 1–11 (siehe S. 16).

- (55) Bowser, M. T., (2005). SELEX: Just another separation? *The Analyst* 130, 128 (siehe S. 18).
- (56) Levay, A., Brenneman, R., Hoinka, J., Sant, D., Cardone, M., Trinchieri, G., Przytycka, T. M., und Berezhnoy, A., (2015). Identifying high-affinity aptamer ligands with defined cross-reactivity using high-throughput guided systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Nucleic Acids Research* 43, e82–e82 (siehe S. 19, 24, 27, 28).
- (57) Mushev, M. U., und Krylov, S. N., (2006). Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Addressing the polymerase chain reaction issue. *Analytica Chimica Acta* 564, 91–96 (siehe S. 20, 21, 23).
- (58) Aird, D., Ross, M. G., Chen, W. S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D. B., Nusbaum, C., und Gnirke, A., (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology* 12, R18 (siehe S. 20).
- (59) Thiel, W. H., Bair, T., Wyatt Thiel, K., Dassie, J. P., Rockey, W. M., Howell, C. A., Liu, X. Y., Dupuy, A. J., Huang, L., Owczarzy, R., Behlke, M. A., McNamara, J. O., und Giangrande, P. H., (2011). Nucleotide Bias Observed with a Short SELEX RNA Aptamer Library. *Nucleic Acid Therapeutics* 21, 253–263 (siehe S. 20, 21).
- (60) Dabney, J., und Meyer, M., (2012). Length and GC-biases during sequencing library amplification: A comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries. *BioTechniques* 52, 631 (siehe S. 20).
- (61) Kalle, E., Kubista, M., und Rensing, C., (2014). Multi-template polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification* 2, 11–29 (siehe S. 20, 21, 23, 24).
- (62) Pan, W., Byrne-steele, M., Wang, C., Lu, S., Clemmons, S., Zahorchak, R. J., und Han, J., (2014). DNA polymerase preference determines PCR priming efficiency. *BMC Biotechnology* 14 (siehe S. 20).

- (63) Takahashi, M., Wu, X., Ho, M., Chomchan, P., Rossi, J. J., Burnett, J. C., und Zhou, J., (2016). High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency. *Scientific Reports* 6, 33697 (siehe S. 21, 23).
- (64) Kainz, P., (2000). The PCR plateau phase - Towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1494, 23–27 (siehe S. 21).
- (65) Hunninger, T., Wessels, H., Fischer, C., Paschke-kratzen, A., und Fischer, M., (2014). Aptamers Using Magnetic Separation and BEAMing. *Analytical chemistry* 86, 10940–10947 (siehe S. 21).
- (66) Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J., und Mayer, G., (2014). By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PLoS one* 9, e114693 (siehe S. 21, 22).
- (67) Shao, K., Ding, W., Wang, F., Li, H., Ma, D., und Wang, H., (2011). Emulsion PCR: A high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PLoS ONE* 6, 1–7 (siehe S. 21, 24).
- (68) Schütze, T., Wilhelm, B., Greiner, N., Braun, H., Peter, F., Mörl, M., Erdmann, V. A., Lehrach, H., Konthur, Z., Menger, M., Arndt, P. F., und Glökler, J., (2011). Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS ONE* 6, 1–10 (siehe S. 23, 27).
- (69) Charlton, J., und Smith, D., (1999). Estimation of SELEX pool size by measurement of DNA renaturation rates. *RNA* 5, 1326–1332 (siehe S. 26).
- (70) 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, DOI: 10.1093/nar/gkp1108 (siehe S. 26, 45).
- (71) Baum, P. D., Young, J. J., Zhang, Q., Kasakow, Z., und McCune, J. M., (2011). Design, construction, and validation of a modular library of sequence diversity

- standards for polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 411, 106–115 (siehe S. 26).
- (72) Hoon, S., Zhou, B., Janda, K. D., Brenner, S., und Scolnick, J., (2011). Aptamer selection by high-throughput sequencing and informatic analysis. *BioTechniques* 51, 413–416 (siehe S. 27).
- (73) Hoinka, J., Berezhnoy, A., Dao, P., Sauna, Z. E., Gilboa, E., und Przytycka, T. M., (2015). Large scale analysis of the mutational landscape in HT-SELEX improves aptamer discovery. *Nucleic Acids Research* 43, 5699–5707 (siehe S. 27).
- (74) Cho, M., Soo Oh, S., Nie, J., Stewart, R., Eisenstein, M., Chambers, J., Marth, J. D., Walker, F., Thomson, J. A., und Soh, H. T., (2013). Quantitative selection and parallel characterization of aptamers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 18460–18465 (siehe S. 27).
- (75) Berezovski, M. V., Musheev, M. U., Drabovich, A. P., Jitkova, J. V., und Krylov, S. N., (2006). Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. *Nature Protocols* 1, 1359–1369 (siehe S. 27).
- (76) Spill, F., Weinstein, Z. B., Irani Shemirani, A., Ho, N., Desai, D., und Zaman, M. H., (2016). Controlling uncertainty in aptamer selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 12076–12081 (siehe S. 29).
- (77) Dolye, S. A., und Murphy, M. B., Aptamers and Methods for their in vitro Selection and uses thereof. US-Pat., US007329742B2, 2008 (siehe S. 31, 37, 56, 143).
- (78) Kökpinar, Ö., Walter, J.-G., Shoham, Y., Stahl, F., und Scheper, T., (2011). Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2371–2379 (siehe S. 31, 124, 147).
- (79) O’Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R., und Norton, I., (2014). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. *Food Hydrocolloids* 42, 386–396 (siehe S. 33).

- (80) O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., und Norton, I., (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids* 53, 141–154 (siehe S. 33).
- (81) Murphy, M. B., Fuller, S. T., Richardson, P. M., und Doyle, S. A., (2003). An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Research* 31, 110e–110 (siehe S. 40).
- (82) Zhu, X., Xu, Y., Yu, S., Lu, L., Ding, M., Cheng, J., Song, G., Gao, X., Yao, L., Fan, D., Meng, S., Zhang, X., Hu, S., und Tian, Y., (2014). An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 4, 1–8 (siehe S. 52, 73).
- (83) Citartan, M., Tang, T.-h., Tan, S.-c., Hoe, C.-h., Saini, R., Tominaga, J., und Gopinath, S. C., (2012). Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 34, 125–131 (siehe S. 61).
- (84) Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., und Uhlén, M., (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26, 501–510 (siehe S. 64).
- (85) Wu, F., Wang, J., Pu, C., Qiao, L., und Jiang, C., (2015). Wilson's Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 6419–6431 (siehe S. 74, 116–118).
- (86) Arnab Gupta, und Svetlana Lutsenko, (2012). Evolution of Copper Transporting ATPases in Eukaryotic Organisms. *Current Genomics* 13, 124–133 (siehe S. 74, 117).
- (87) 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, 545–550 (siehe S. 83, 84).

- (88) Diehl, F., Li, M., He, Y., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., und Dressman, D., (2006). BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nature Methods* 3, 551–559 (siehe S. 83, 135).
- (89) Witt, M., Phung, N. L., Stalke, A., Walter, J.-G., Stahl, F., von Neuhoff, N., und Scheper, T., (2017). Comparing two conventional methods of emulsion PCR and optimizing of Tegosoft-based emulsion PCR. *Engineering in Life Sciences* 17, 953–958 (siehe S. 84, 136).
- (90) Schütze, T., und Glökler, J., (2011). Idiot-proof emulsion PCR. *Lab Times*, 50 (siehe S. 84, 88, 137).
- (91) Forbes, J. R., und Cox, D. W., (2000). Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Human Molecular Genetics* 9, 1927–1935 (siehe S. 116, 117).

### Online Quellen

- (92) Kalendar, R., und Lee, D., Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis: jPCR., <http://primerdigital.com/tools/> (besucht am 14. Nov. 2018) (siehe S. 43).
- (93) Zuker, M., Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction., <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold> (besucht am 14. Nov. 2018) (siehe S. 43).
- (94) Integrated DNA Technologies, IDT's Oligo Analyzer Version 3.1., <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (besucht am 14. Nov. 2018) (siehe S. 43).
- (95) Integrated DNA Technologies, IDT's PrimerQuest Software (2012)., <https://eu.idtdna.com/PrimerQuest> (besucht am 14. Nov. 2018) (siehe S. 48).
- (96) The UniProt Consortium, UniProtKB - P35670 (ATP7B\_HUMAN)., <https://www.uniprot.org/uniprot/P35670> (besucht am 14. Nov. 2018) (siehe S. 117).

# Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Ablauf eines SELEX-Prozesses . . . . .	4
2.1.2	Auswahl möglicher Sekundärstruktur motive von Aptameren . . . . .	6
2.1.3	Schema Asymmetrische PCR . . . . .	15
2.2.1	Schematische Darstellung der Entstehung von <i>ladder type</i> und <i>non ladder type</i> Nebenprodukten in einer multitemplate PCR . . . . .	22
2.2.2	Schema der Emulsions-PCR . . . . .	24
3.1.1	Immobilisierung von Proteinen auf tosylaktivierten Magnetpartikeln . . . . .	35
3.1.2	Bestimmung der maximalen Immobilisierungsdichte tosylaktivierter Magnetpartikel	36
3.1.3	Struktureller Aufbau der Aptamerkandidaten . . . . .	37
3.1.4	Optimierung der Annealingtemperatur in der Real Time PCR . . . . .	41
3.1.5	Optimierung der Primerkonzentration in der Real Time PCR . . . . .	41
3.1.6	Bestimmung des dynamischen Bereichs in der Real Time PCR . . . . .	44
3.1.7	Schmelzkurven der Referenzsubstanzen in der Real Time PCR . . . . .	45
3.1.8	Diversitätsstandards für die Real Time PCR . . . . .	46
3.1.9	Schmelzkurven der Diversitätsstandards . . . . .	46
3.1.10	Real Time PCR mit Hydrolysesonde . . . . .	48
3.1.11	Effizienzbestimmung der Real Time PCR mit Hydrolysesonde . . . . .	49
3.1.12	Evaluierung der Detektion von 6H7 im Gemisch . . . . .	50
3.1.13	Quantifizierung mit OliGreen . . . . .	51
3.1.14	Vergleich PCR-Produkt zu Einzelstrang . . . . .	53
3.1.15	SELEX-Prozess . . . . .	55
3.1.16	Simulierte Selektion gegen His-Tag Protein . . . . .	57
3.1.17	Nebenprodukte bei der Amplifikation von Aptamerkandidaten . . . . .	59
3.1.18	Vergleich der Nebenproduktbildung bei Einsatz unterschiedlicher Polymerasen . . .	60
3.1.19	Asymmetrische PCR 20:1 . . . . .	61
3.1.20	Vergleich Asymmetrische PCR 20:1 mit 20:0 . . . . .	62
3.1.21	Strangtrennung . . . . .	65
3.1.22	Vergleich Magnetpartikel für Strangtrennung . . . . .	66
3.1.23	Menge an eluierten Einzelsträngen von Streptavidin-Magnetpartikeln der Firma Invitrogen . . . . .	67
3.1.24	Test der automatisierten Selektion mit dem 6H7-Aptamers . . . . .	69

## Abbildungsverzeichnis

---

3.1.25	Schmelzkurven der PCR-Produkte (His-Tag SELEX) . . . . .	71
3.1.26	PCR-Produkte aus dem His-Tag SELEX . . . . .	73
3.2.1	Schematischer Aufbau des Proteins ATP7B . . . . .	74
3.2.2	Schematische Darstellung des ATP7B-Fusionsproteins . . . . .	76
3.2.3	Schematischer Aufbau des ATP7B-Plasmid . . . . .	77
3.2.4	Gel ATP7B Produktion . . . . .	78
3.2.5	Gel ATP7B Immobilisierung . . . . .	79
3.2.6	Bildung von Nebenprodukten während der PCR im SELEX-Prozess gegen ATP7B .	82
3.2.7	BSA in der EmulsionsPCR . . . . .	84
3.2.8	Phasenkontrastmikrographen der Emulsion bei verschiedenen Emulsifikationsdauern für die EmulsionsPCR . . . . .	86
3.2.9	Test der Emulsifikationsdauer für die EmulsionsPCR . . . . .	86
3.2.10	Entstehung von Nebenprodukten in der EmulsionsPCR in Abhängigkeit der Eingangskonzentration . . . . .	88
3.2.11	Fluoreszenzmarkierung von Aptamerkandidaten in der EmulsionsPCR . . . . .	90
A. 1	Nebenproduktbildung während der Amplifikation von Aptamerkandidaten bei Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen. . . . .	115
A. 2	Schematischer Aufbau des Proteins ATP7B . . . . .	117
C. 3	Plasmid pJOE2792 . . . . .	148
C. 4	Aufbau des ATP7B-Plasmid . . . . .	149

# Tabellenverzeichnis

3.1.1	Produzierte His-Tag-Proteine . . . . .	32
3.1.2	Densitometrisch geschätzte Reinheit der produzierten Proteine nach dem jeweiligem Prozessschritt . . . . .	34
3.1.3	Bestandteile und Funktion des Selektionspuffers im Modellprozess . . . . .	39
3.1.4	Vergleich verschiedener Färbemethoden für DNA in Polyacrylamid-Gelen . . . . .	52
3.2.1	Bestandteile und Funktion des verbesserten Selektionspuffers . . . . .	81
3.3.1	Zeitersparnis in einer Selektionsrunde in der optimierten SELEX gegenüber der konventionellen SELEX . . . . .	93
B. 1	Puffer für Gelelektrophoresen und korrespondierende Färbemethoden . . . . .	119
B. 2	Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-PAGE Gele . . . . .	120
B. 3	Zusammensetzung der Gele für DNA-PAGE . . . . .	121
B. 4	Zusammensetzung der Real Time PCR . . . . .	123
B. 5	Temperaturprogramm der Real Time PCR . . . . .	123
B. 6	Zusammensetzung der Real Time PCR für das Aptamer 6H7 . . . . .	124
B. 7	Temperaturprogramm der Real Time PCR für das Aptamer 6H7 . . . . .	124
B. 8	His-Tag-Proteine . . . . .	125
B. 9	Verwendete Lösungen für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen . . . . .	125
B. 10	Verwendete Lösungen für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne . . . . .	128
B. 11	Puffer für die minimale SELEX . . . . .	130
B. 12	Zusammensetzung der ersten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten . . .	131
B. 13	Temperaturprogramm der ersten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten .	132
B. 14	Zusammensetzung der zweiten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten . .	132
B. 15	Temperaturprogramm der zweiten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten	132
B. 16	Automatisierter Selektionsschritt . . . . .	133
B. 17	Zusammensetzung der Puffer für die optimierte SELEX . . . . .	135
B. 18	Zusammensetzung der wässrigen Phase der EmulsionsPCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten . . . . .	136
B. 19	Temperaturprogramm der EmulsionsPCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten	137
C. 22	Eingesetzte Oligonukleotide . . . . .	144

## A Zusätzliche Informationen

### A.1 Entstehung von Nebenprodukten bei Verwendung verschiedener Polymerasen

Die Entstehung von Nebenprodukten in der PCR ist für die SELEX ein signifikantes Hindernis. Daher wurde die Nebenproduktbildung in der PCR bei insgesamt sechs unterschiedlichen DNA-Polymerasen untersucht (vgl. Abb. A. 1).

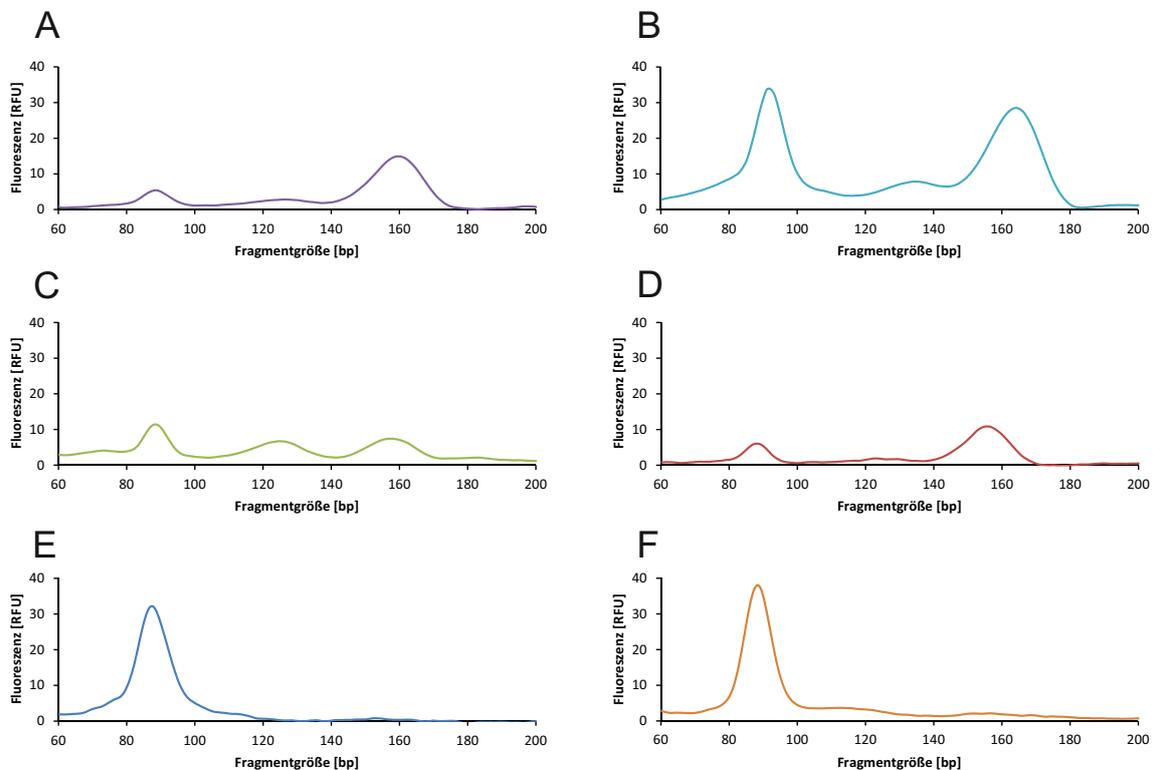


Abb. A. 1: Nebenproduktbildung während der Amplifikation von Aptamerkandidaten bei Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen. Ex Taq DNA Polymerase von TaKaRa (A), GoTaq DNA Polymerase von Promega (B), HotStarTaq Plus DNA Polymerase von Qiagen (C), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase von NEB (D), Platinum Pfx DNA Polymerase von Thermo Scientific (E), Q5 High-Fidelity DNA Polymerase von NEB (F)

Die Nebenproduktbildung bei Verwendung der GoTaq Polymerase, der HotStarTaq Plus Polymerase und der Platinum Pfx Polymerase wurden bereits im experimen-

tellen Teil beschrieben (siehe: *Amplifikation der Aptamerkandidaten* auf S. 58). So führt der Einsatz der GoTaq DNA Polymerase und der HotStarTaq Plus Polymerase neben der Bildung des erwünschten Hauptprodukts von etwas über 80 bp zusätzlich zur Bildung von Nebenprodukten der Länge von etwa 120 bp und 160 bp. Dabei beträgt der Anteil der Nebenprodukte für die HotStarTaq Plus Polymerase jeweils 33 %, während die GoTaq DNA Polymerase einen kleineren Anteil an Nebenprodukt der Größe von 120 bp erzeugt. Die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und die Ex Taq DNA Polymerase erzeugen nur geringe Anteile an Nebenprodukten der Größe 120 bp, dafür entstehen während der Reaktion jedoch große Anteile an Nebenprodukten der Größe 160 bp, während lediglich ein kleiner Anteil am gewünschten Produkt erzeugt wird. Kaum messbare Nebenprodukte entstehen jedoch bei Verwendung der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, hier ist lediglich ein kleiner Anteil an Nebenprodukt der Größe 120 bp nachweisbar. Die Platinum Pfx DNA Polymerase erzeugt dagegen keine messbaren Nebenprodukte und wurde daher für den Einsatz in der SELEX ausgewählt.

### A.2 Zusätzliche Informationen zum ATP7B-Protein

Dieses Protein ist hauptsächlich in der Membran des trans-Golgi-Apparates von Leberzellen des Menschen und vielen Tieren lokalisiert und spielt eine zentrale Rolle im Kupferstoffwechsel <sup>(91)</sup>. ATP7B ist mit 1.465 Aminosäuren und etwa 165 kDa ein recht großes Protein. Es besteht aus insgesamt acht Transmembrandomänen, einer ATP-Bindestelle (N-Domäne), einer Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne), einer Phosphatasedomäne (A-Domäne) und 6 N-terminalen Kupferbindestellen (vgl. Abb. A. 2) <sup>(85)</sup>. Die Transmembrandomänen bilden zusammen einen Kanal durch die Membran <sup>(85)</sup>. Nach der Anlagerung von ATP in die N-Domäne erfolgt die Bindung des Kupfers in einer der Kupferbindestellen. Eine Auto-Phosphorylierung führt durch Konformationsänderung zum Transport des Kupfers auf die andere Membranseite, wo das Kupfer anschließend abgegeben wird. Die Dephosphorylierung hat die Rückfaltung in den Anfangszustand zur Fol-

ge, sodass weitere Kupferionen durch die Membran transportiert werden können. Neben der kanonischen Form gibt es insgesamt 5 Isoformen die durch alternatives Spleißen und ribosomale Frameshifts entstehen <sup>(96)</sup>.

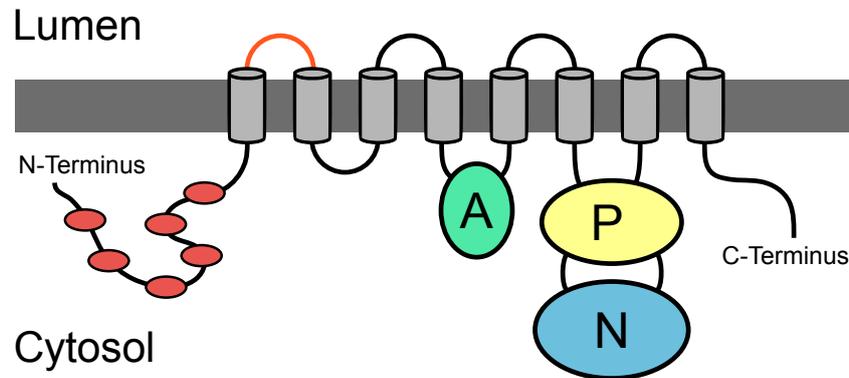


Abb. A. 2: Schematischer Aufbau des Proteins ATP7B: acht Transmembrandomänen, ATP-Bindestelle (N), Phosphorylierungsdomäne (P), Phosphatasedomäne (A) und 6 N-terminale Kupferbindestellen <sup>nach (86)</sup>

Eine Funktion von ATP7B ist die Weitergabe von Kupfer an das Blutplasma protein Caeruloplasmin, das die Kupferionen im Körper verteilt. Steigt die Kupferkonzentration in den Hepatozyten, verschiebt sich die Lokalisation des ATP7Bs in die cytoplasmatischen Vesikel <sup>(91)</sup>. Von hier aus wird dann überschüssiges Kupfer in den Gallengang (*Canaliculi biliferi*) abgegeben und anschließend mit dem Stuhl ausgeschieden.

Bei einem Defekt des Proteins ist der Kupferstoffwechsel gestört, es entstehen Einlagerungen von Kupfer in die Leber, in das zentrale Nervensystem und die Iris der Augen. Entsprechend geht diese Erkrankung mit einer Leberzirrhose und Neurodegeneration einher, die auch psychische Störungen zur Folge hat <sup>(85)</sup>. Ursächlich für Defekte des APT7B-Proteins sind Genmutationen, die rezessiv vererbt werden. Subzellulär ist das ATP7B-Protein bei vielen Mutationen fehllokalisiert <sup>(91)</sup>. Die Aufstellung einer Verdachtsdiagnose ist schwierig, da die einzelnen Symptome primär anderen Erkrankungen zugeschrieben werden <sup>(85)</sup>. Labortechnisch kann die Wilson-Krankheit durch erhöhte Kupferwerte in der Leber und durch gezielte molekulargenetische Analysen nachgewiesen werden <sup>(85)</sup>.

Unbehandelt verläuft die Krankheit über einen mehrjährigen Verlauf tödlich, schwere Formen können auch trotz Behandlung tödlich verlaufen. Im Zentrum der Therapie steht die Reduktion der Kupferlast des Körpers entweder durch verminderte Aufnahme von Kupfer (Diät; Resorptionshemmer) oder die erhöhte Ausscheidung von Kupfer in chelatisierter Form mit dem Urin (Einsatz von Chelatbildnern) <sup>(85)</sup>. Bei starker Schädigung der Leber kann eine Lebertransplantation nötig sein, wobei die transplantierten Leberzellen die Krankheit heilen, da diese eine normale Kupferausscheidung ermöglichen <sup>(85)</sup>.

### B Methoden

#### B.1 Gelelektrophoresen und korrespondierende Färbemethoden

##### B.1.1 Puffer für Gelelektrophoresen und korrespondierende Färbemethoden

Viele der hier beschriebenen Methoden nutzen teilweise die gleichen Puffer, die deshalb hier zusammengefasst dargestellt werden (vgl. Tab. B. 1).

Tab. B. 1: Puffer für Gelelektrophoresen und korrespondierende Färbemethoden

Entfärber/Fixierer (Silber)	45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Farmers Reducer	1 Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat III, 1 Spatelspitze Natriumthiosulfat in 100 ml deio. H <sub>2</sub> O
Fixierer (Coomassie)	20 % (v/v) Phosphorsäure, 50 % (v/v) Ethanol
Formaldehyd-Lösung	300 µl Formaldehyd in 100 ml 2,5 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Kolloidales Coomassie	0,12 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat, 10 % (v/v) Phosphorsäure, 20 % (v/v) Methanol
Lämmli-Puffer	20 mM Tris-Base, 2 mM EDTA (Na <sup>+</sup> -Salz), 5 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TGS-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3

##### B.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Proben werden mit dem entsprechenden Volumen DNA Gel Loading Dye (6 x) (Thermo Scientific) versetzt, sodass die Konzentration des Loading Dyes in der Probe 1 x ist. Das Gel wird aus 100 ml 1 x TAE-Puffer (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119), 5 µl

Roti-Gelstain und 2 g Agarose durch Aufkochen der Agarose herstellt. Die Trennung der Proben erfolgt dann in einem 2%igen Agarose-Gel bei 135 V für 45 min mit 1 x TAE als Laufpuffer. Marker: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Nach dem Gellauf wird das Gel in einem INTAS Gel iX Imager dokumentiert.

### B.1.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die Proben werden zur Vorbereitung 1:1 mit Lämmli-Puffer versetzt (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119), bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend für 5 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Die Gele der diskontinuierlichen SDS-PAGE bestehen aus einem Sammelgel (vgl. Tab. B. 2), dass die Proteine der Probe fokussiert, und einem Trenngel, in dem anschließend nach Masse-Ladungsverhältnis getrennt wird. Die Analyse der Proben erfolgt dabei mit 1 x TGS als Laufpuffer zunächst bei 100 V bis das Sammelgel durchlaufen ist, anschließend mit 180 V. Marker: PageRuler Unstained Protein Ladder (10 - 200 kDa) (Thermo Scientific). Das Gel wird nach dem Gellauf entweder mit kolloidalem Coomassie oder mit der Silberfärbung gefärbt.

Tab. B. 2: Zusammensetzung der diskontinuierlichen SDS-PAGE Gele

<b>Substanz</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5/1) 40 % (w/v)	4,5 ml	750 µl
SDS (1 % (w/v))	1,5 ml	300 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	—	630 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	4,2 ml	—
deio. H <sub>2</sub> O	4,8 ml	3,77 ml
TEMED	30 µl	10 µl
APS (25 % (w/v))	30 µl	10 µl

### B.1.4 PAGE für DNA

Die Proben werden zur Vorbereitung mit dem entsprechenden Volumen DNA Gel Loading Dye (6 x) (Thermo Scientific) versetzt, sodass die Konzentration des Load-

ing Dyes in der Probe 1 x ist. Die Trennung der Proben erfolgt dann in einem 12,5 %igen Polyacrylamid–Gel (vgl. Tab. B. 3) bei 100 V mit 1 x TAE als Laufpuffer (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119). Soll eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt werden, muss dem Gel 6,3 g Harnstoff zugegeben werden (final 7 M). Marker: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Das Gel wird nach dem Gellauf entweder mit Sybr Green II, Roti–GelStain oder mit der Silberfärbung gefärbt und entsprechend dokumentiert.

Tab. B. 3: Zusammensetzung der Gele für DNA–PAGE

<b>Substanz</b>	
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5/1) 40 % (w/v)	4,68 ml
TAE–Puffer (50 x)	300 µl
deio. H <sub>2</sub> O	9,86 ml
TEMED	110 µl
APS (25 % (w/v))	50 µl
(für denaturierendes Gel: Harnstoff)	6,3 g

### B.1.5 Färben einer SDS–PAGE mit kolloidalem Coomassie

Nach der Elektrophorese wird das Gel kurz mit deio. H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wird das Gel 2 mal für 20 Minuten im Fixierer inkubiert (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119). Die Färbung erfolgt dann in der Lösung des kolloidalen Coomassie über Nacht. Danach erfolgt die Entfärbung des Hintergrunds mit Wasser für mindestens 2 mal 30 Minuten. Das Gel wird mit einem Perfection 1260 Photo Scanner (epson) dokumentiert.

### B.1.6 Silberfärbung für SDS–PAGE und DNA–PAGE

Das Gel wird zunächst für 20 min in Entfärber/Fixierer inkubiert (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119). Anschließend wird es 2 x kurz mit deio. H<sub>2</sub>O gespült und für 2,5 min mit Farmers Reducer behandelt. Danach wird das Gel 2 x 10 min in deio. H<sub>2</sub>O

gewaschen und anschließend für 30 min in 0,1 % (w/v) Silbernitrat-Lösung inkubiert. Das Gel wird 2 x 0,5 min mit deio. H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend kurz mit 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat-Lösung gespült. Die Entwicklung der Färbung erfolgt durch Zugabe von Formaldehyd-Lösung. Durch Einsatz von 5 % (v/v) Essigsäure für 10 min wird die Färbung gestoppt. Das Gel wird in deio. H<sub>2</sub>O gewaschen und mit einem Perfection 1260 Photo Scanner (epson) dokumentiert.

### B.1.7 Färben von DNA-PAGE Gelen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Der Farbstoff wird aus seiner Stammlösung mit 1 x TAE-Lösung (vgl. Tab. B. 1 auf S. 119) auf die Konzentration 2,5 x verdünnt. Das Gel wird nach dem Gellauf für 10 Minuten in dieser 2,5 x Farbstofflösung inkubiert. Anschließend erfolgt die Dokumentation des Gels mit einem INTAS Gel iX Imager. Gilt für: Roti-GelStain (Roth); Sybr Green I (Amresco), Sybr Green II (Amresco), EvaGreen (Biotium).

## B.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Dazu werden in einer Mikrotiterplatte 25 µl Probe mit 200 µl des *BCA Working Reagent* versetzt, mittels Schütteln der Platte werden dann die Lösungen vermischt. Es folgt eine Inkubation im Dunkeln bei 37 °C für 30 min. Nach Abkühlung der Platte auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 562 nm in einem Platen-Spektralphotometer gemessen. Die Kalibration erfolgt durch Einsatz einer BSA Verdünnungsreihe.

## B.3 Real Time PCR

Die Real Time PCR wird mit dem GoTaq Green Master Mix von Promega durchgeführt. Jede Reaktion hat dabei ein Volumen von 25 µl (vgl. Tab. B. 4), wobei von jeder Probe drei Replikate vermessen werden. Die Messung wird in einem iQ5 Real Time PCR Detection System durchgeführt (Biorad) (vgl. Tab. B. 5). Die Quan-

tifizierung erfolgt anhand einer Standardkurve der Referenzsubstanz, die über dekadische Verdünnungsreihen im Bereich von 100 fM bis 10 nM ermittelt wird. Als Referenzsubstanzen dienen entweder die Bibliothek unselektierter Aptamerkandidaten oder die konstruierte Einzelsequenz (siehe: *Referenzsubstanzen für die Real Time PCR* auf S. 42). Die aufgenommenen Schmelzkurven können zur Diversitätsbestimmung herangezogen werden (siehe: *Diversitätsstandards für die Real Time PCR* auf S. 45).

Tab. B. 4: Zusammensetzung der Real Time PCR

Komponente	Konz. Stock	Konz. final	Volumen Stock
Probe / Standard	?	?	1 $\mu$ l
GoTaq Green Master Mix	2 x	1 x	12,5 $\mu$ l
Primer-Mix (Selex-F + Selex-R)	je 10 $\mu$ M	je 0,4 $\mu$ M	1 $\mu$ l
deio. H <sub>2</sub> O			10,5 $\mu$ l

Tab. B. 5: Temperaturprogramm der Real Time PCR

	95 °C	3 min	
40x	95 °C	15 s	
	56 °C	30 s	Messung der Real Time Daten
	72 °C	10 s	
	75 °C	5 min	
	50 → 95 °C	Schmelzkurve (je 6 s; $\Delta T = 0,5$ K)	

### Real Time PCR für das Aptamer 6H7

Die Real Time PCR zur Quantifizierung des 6H7-Aptamers wird mit dem GoTaq Probe qPCR Master Mix von Promega und der 6H7-Hydrolysesonde durchgeführt (vgl. Tab. B. 6 und Tab. B. 7). Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Standardkurve des Aptamers 6H7, über eine dekadische Verdünnungsreihe im Bereich von

## Anhang

---

100 fM bis 10 nM. Die 6H7-Hydrolysesonde verfügt über Fluorescein als Fluorophor und sowohl über den ZEN Quencher, als auch den IOWA-Black Quencher.

Die 6H7-Hydrolysesonde hat die Sequenz:

5-/FAM/TATGGGTGG/ZEN/TCTGGTTGGGATTGG/IOWA-Black/-3.

Tab. B. 6: Zusammensetzung der Real Time PCR für das Aptamer 6H7

Komponente	Konz. Stock	Konz. final	Volumen Stock
Probe / Standard	?	?	1 $\mu$ l
GoTaq Probe qPCR Master Mix	2 x	1 x	12,5 $\mu$ l
Primer-Mix (Selex-F + Selex-R)	je 10 $\mu$ M	je 0,4 $\mu$ M	1 $\mu$ l
6H7-Hydrolysesonde	2,5 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	2 $\mu$ l
deio. H <sub>2</sub> O			8,5 $\mu$ l

Tab. B. 7: Temperaturprogramm der Real Time PCR für das Aptamer 6H7

	95 °C	3 min	
40x	95 °C	30 s	
	56 °C	30 s	Messung der Real Time Daten
	72 °C	30 s	

### B.4 Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen

Insgesamt wurden 4 verschiedene His-Tag-Proteine hergestellt (vgl. Tab. B. 8). Die Plasmide stammen aus vorangegangenen Projekten<sup>(78)</sup> und lagen bereits in *E. coli* K12 vor.

Tab. B. 8: His-Tag-Proteine

Protein	Kürzel	Molekulargewicht
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I	PFEI-His	30 kDa
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	SubE-His	32 kDa
<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase	pNBE-His	54 kDa
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase	BSTE-His	31 kDa

### B.4.1 Puffer für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen

Tabelle B. 9 gibt einen Überblick über die hier verwendeten Puffer und Lösungen.

Tab. B. 9: Verwendete Lösungen für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung von His-Tag-Proteinen

Bead-Blockpuffer	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
Bead-Lagerpuffer	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,1 % (w/v) Natriumazid, pH 7,4
Beadpuffer B	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
IEX-Bindepuffer	20 mM bis-Tris, pH 7,0
IEX-Elutionspuffer	20 mM bis-Tris, 1 M NaCl, pH 7,0
IMAC-Bindepuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,4
IMAC-Elutionspuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4
IMAC-Strippingpuffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7,4
Kobalt-Salzlösung	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 100 mM CoCl <sub>2</sub> , pH 7,4
LB-Medium	10 g·l <sup>-1</sup> Trypton, 10 g·l <sup>-1</sup> NaCl, 5 g·l <sup>-1</sup> Hefeextrakt

### B.4.2 Produktion, Ernte, Zellaufschluss

Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C und 120 Upm in LB<sup>amp</sup>-Medium (Ampicillin 75 mg·l<sup>-1</sup>) (vgl. Tab. B. 9 auf S. 125). Ab einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 wird die Produk-

tion der Targets durch 0,2% (w/v) Rhamnose induziert. Nach 4 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation bei 3345 xg und 4 °C für 30 min geerntet, in IMAC-Bindepuffer resuspendiert und anschließend mittels Ultraschall lysiert. Der Zellaufschluss erfolgt dabei mit einer Labsonic M Ultraschallsonde (Sartorius) für insgesamt 2,5 Minuten, wobei je nach 30 Sekunden für 30 Sekunden unterbrochen wurde, um die eingetragene Wärme auf Eis abzuführen.

### B.4.3 Proteinaufreinigung mittels IMAC

Die IMAC wird in einem BioLogic DuoFlow system (Biorad) durchgeführt. Als stationäre Phase für die IMAC wird eine HisTrap HP 5 ml Säule eingesetzt (GE Healthcare). Vor der IMAC muss die Säule für den bevorstehenden Einsatz vorbereitet werden. Verbleibende Kontaminationen oder Metallionen werden durch Spülen mit 25 ml IMAC-Strippingpuffer entfernt (vgl. Tab. B.9 auf S. 125). Danach wird die Säule mit 50 ml deio. H<sub>2</sub>O gespült, durch das Spülen mit 20 ml IMAC-Bindepuffer werden wieder Bindebedingungen hergestellt und anschließend werden die NTA-Gruppen mit 10 ml Kobalt-Salzlösung beladen. Überschüssige Kobaltionen werden durch Spülen mit 25 ml IMAC-Bindepuffer entfernt.

Vor dem Probenauftrag muss die Säule erneut mit 50 ml IMAC-Bindungspuffer gespült werden. Nach dem Probenauftrag werden ungebundene Kontaminationen durch Spülen mit 50 ml IMAC-Bindepuffer entfernt. Die Elution erfolgt im linearen Gradienten zwischen IMAC-Bindepuffer und Elutionspuffer bei einem Startverhältnis von 0/100 und einem Endverhältnis von 100/0 bei einem Gesamtvolumen von 50 ml. Danach wird die Säule mit 20 ml IMAC-Elutionspuffer gespült. Nach der Elution muss die Säule durch Spülen mit 25 ml IMAC-Bindepuffer für die nächste Probe vorbereitet werden. Die Flussrate liegt für alle Schritte bei 5 ml·min<sup>-1</sup>, außer für den Probenauftrag (1 ml·min<sup>-1</sup>). Die FPLC wird durch die Messung der Absorption bei 280 nm, die Leitfähigkeit der Probe und den Säulendruck überwacht. Der Durchlauf wird jeweils in 5 ml Fraktionen gesammelt.

### B.4.4 Proteinaufreinigung mittels IEX

Die IEX wird in einem BioLogic DuoFlow system (Biorad) durchgeführt. Als stationäre Phase für die IEX wird eine HiTrap Q HP 1 ml Säule eingesetzt (GE Healthcare). Vor Beginn der IEX wird die Säule mit 10 ml IEX-Bindepuffer gespült (vgl. Tab. B. 9 auf S. 125). Nach dem Probenauftrag werden ungebundene Moleküle mit 5 ml IEX-Bindepuffer entfernt. Die Elution erfolgt im linearen Gradienten zwischen IEX-Bindepuffer und Elutionspuffer bei einem Startverhältnis von 0/100 und einem Endverhältnis von 100/0 bei einem Gesamtvolumen von 20 ml. Danach wird die Säule zuerst mit 5 ml IEX-Elutionspuffer dann mit 5 ml IEX-Bindepuffer gewaschen. Die Flussrate liegt für alle Schritte bei  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Auch hier wird die FPLC durch Messung der Absorption bei 280 nm, der Leitfähigkeit der Probe und des Säulendrucks überwacht. Der Durchlauf wird jeweils in 1 ml Fraktionen gesammelt.

### B.4.5 Immobilisierung von His-Tag-Proteinen

Für die SELEX werden die His-Tag-Proteine auf Dynabeads M-280 Tosylactivated (Thermo Scientific) immobilisiert. Dazu werden 1 mg Magnetpartikel zunächst mit 1 ml Beadpuffer B gewaschen (vgl. Tab. B. 9 auf S. 125). Anschließend werden die Magnetpartikel mit 100  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung für 18 h bei  $20^\circ\text{C}$  auf einem Rotator (20 Upm) inkubiert. Danach werden die unreaktierten Tosylgruppen für 1 h mit Bead-Blockpuffer geblockt, sodass die Oberfläche der Magnetpartikel inaktiviert und alle tosylaktivierten Linker abreagiert sind. Die Magnetpartikel werden abschließend 2 x 15 s mit Bead-Lagerpuffer gewaschen. Die Lagerung der immobilisierten His-Tag-Proteine erfolgt bei  $4^\circ\text{C}$ .

### B.4.6 Pufferaustausch

Für eine wiederholte IMAC oder eine IEX nach einer IMAC ist es nötig die Proteine in das jeweilige Puffersystem zu überführen. Dazu wurden die Proteine nach Herstellerangabe mehrfach mit bis zu 5 Volumen des gewünschten Puffers in Viva-

spin 20 Ultrafiltrationseinheiten (Sartorius) mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 10 kDa gewaschen.

### B.5 Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne

#### B.5.1 Verwendete Lösungen für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne

Die zur Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne verwendeten Puffer sind in Tabelle B. 10 dargestellt.

Tab. B. 10: Verwendete Lösungen für die Produktion, Aufreinigung und Immobilisierung der ATP7B N-Domäne

Bindepuffer	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Tween 20, pH 8,5
LB-Medium	10 g·l <sup>-1</sup> Trypton, 10 g·l <sup>-1</sup> NaCl, 5 g·l <sup>-1</sup> Hefeextrakt
Lysispuffer	50 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 x Halt Protease Inhibitor Cocktail, pH 8,2
TSS	10 % (v/v) PEG 8000, 5 % (v/v) DMSO, 30 mM MgCl <sub>2</sub> in LB-Medium

#### B.5.2 Transformation von *E. coli* BL21 (DE3)

In Vorbereitung zur Transformation wird eine Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3) in LB-Medium bei 37 °C und 180 Upm angezogen (vgl. Tab. B. 10 auf S. 128). Aus dieser Vorkultur wird die Hauptkultur gestartet, die bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 angezogen wird. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 werden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (1000 xg, 10 min) und anschließend in 10 ml TSS resuspendiert. Von dieser Bakterienlösung werden 200 µl mit 100 ng ATP7B-Plasmid gemischt und anschließend für 1 h bei 4 °C gemeinsam inkubiert. Die Transformation erfolgt durch Hitzeschock bei 42 °C für 2 min, danach werden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium werden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 300 min<sup>-1</sup> kultiviert, bevor sie auf LB-Agar-Platten (1,5 % (w/v)) ausplattiert werden können und über Nacht bei 37 °C auf den Platten heranwach-

sen.

### B.5.3 Produktion, Ernte, Zellaufschluss

Für die Produktion des Fusionsproteins wird eine Einzelkolonie der transformierten Bakterien in Vorkultur genommen. Die Bakterien werden dazu etwa 18 h in 20 ml LB<sup>amp</sup>-Flüssigmedium (Ampicillin 75 mg·l<sup>-1</sup>) bei 37 °C und 180 Upm kultiviert (vgl. Tab. B. 10 auf S. 128). Die Produktion des Fusionsproteins erfolgt dann in zwei Stufen. Zunächst werden die *E. coli* bei 37 °C und 180 Upm in LB<sup>amp</sup>-Medium (Ampicillin 75 mg·l<sup>-1</sup>) angezogen. Ab einer OD<sub>600 nm</sub> von 1,3 wird die Produktion des ATP7B-Fusionsproteins durch 0,5 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 24 °C gesenkt. Nach 10 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation bei 3345 xg und 4 °C für 30 min geerntet, in Lysispuffer resuspendiert und anschließend mittels Ultraschall lysiert. Der Zellaufschluss erfolgt dabei mit einer Labsonic M Ultraschallsonde (Sartorius) für insgesamt 2,5 Minuten, wobei je nach 30 Sekunden für 30 Sekunden unterbrochen wurde, um die eingetragene Wärme auf Eis abzuführen.

### B.5.4 Immobilisierung des Fusionsproteins

Die ATP7B N-Domäne wird hier über den IMPACT-Tag an Chitinmagnetpartikel immobilisiert (Chitin Magnetic Beads (NEB)). Dazu werden 1 mg Chitinmagnetpartikel zunächst dreimal mit 1 ml Bindepuffer gewaschen (vgl. Tab. B. 10 auf S. 128). Anschließend werden die Magnetpartikel mit 1 ml des Bakterienlysats für 1 h bei 4 °C auf einem Rotator (20 Upm) inkubiert. Danach werden die Magnetpartikel dreimal mit 1 ml Bindepuffer für 5 min gewaschen. Die Lagerung des immobilisierten ATP7B-Fusionsproteins erfolgt bei 4 °C, wobei 0,1 % (w/v) Natriumazid zugegeben werden.

### B.6 Minimale SELEX

#### B.6.1 Puffer für die minimale SELEX

Für die Selektion von Aptameren wurde eine minimale SELEX entworfen, deren Puffer sind in Tabelle B. 11 dargestellt.

Tab. B. 11: Puffer für die minimale SELEX

Basispuffer	50 mM $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ , 2 mM $MgCl_2$ , 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,5
Elutionspuffer	50 mM $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ , 2 mM $MgCl_2$ , 0,05 % (v/v) Tween 20, $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $0,1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ poly-dIdC, Imidazol M, pH 7,5
Neutralisationslösung	100 mM $KH_2PO_4$
Salzlösung	5 M NaCl
Selektionspuffer	50 mM $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ , 2 mM $MgCl_2$ , 0,05 % (v/v) Tween 20, $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BSA, $0,1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ poly-dIdC, pH 7,5
SELEX-PBS	50 mM $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,5
SELEX-PBS-T	50 mM $K_2HPO_4$ , 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5

#### B.6.2 Vorbereitungen zur Selektion

Vor dem Selektionsschritt wird die Bibliothek der Aptamerkandidaten in 100  $\mu\text{l}$  Basispuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wird die Bibliothek auf 4 °C abgekühlt und es werden 1 ml Selektionspuffer zugegeben (vgl. Tab. B. 11 auf S. 130), was eine Faltung der Aptamerkandidaten ermöglicht. Parallel werden die auf Magnetpartikeln immobilisierten Zielmoleküle durch Waschen der Magnetpartikel mit 1 ml Selektionspuffer für die Selektion vorbereitet.

### B.6.3 Selektionsschritt

Der Selektionsschritt beginnt mit der gemeinsamen Inkubation der Aptamerkandidaten mit den immobilisierten Zielmolekülen bei 20 °C für 30 min in einem Rotator (20 Upm). Anschließend werden die Magnetpartikel 3 mal für 5 min mit 1 ml SELEX-Basispuffer gewaschen (vgl. Tab. B. 11 auf S. 130). Die Elution der gebundenen Aptamerkandidaten erfolgt dann durch Zugabe von 100 µl 95 °C heißem SELEX-PBS auf die Magnetpartikel für 5 min im Thermomixer bei 300 Upm. Nach Ablauf der 5 Minuten wird der Überstand über den Magnetpartikeln entnommen, darin sind die nun eluierten Aptamerkandidaten enthalten.

### B.6.4 Amplifikation der Aptamerkandidaten

Die Amplifikation der eluierten Aptamerkandidaten erfolgt mit einem biotinylierten *antisense* Primer in zwei aufeinanderfolgenden PCRs (vgl. Tab. B. 12 und Tab. B. 13, sowie Tab. B. 14 und Tab. B. 15)

Tab. B. 12: Zusammensetzung der ersten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

Komponente	Konz. Stock	Konz. final	Volumen Stock
Template (Eluat aus Selektionsschritt)	?	?	max. 80,2 µl
Platinum PFX Polymerase	2,5 U/µl	2 U/100 µl	0,8 µl
10 x PFX Reaction Puffer	10 x	1 x	10 µl
dNTP-Mix	je 10 mM	je 0,2 mM	2 µl
Primer-Mix (Selex-F + Selex-R-bio)	je 10 µM	je 0,5 µM	5 µl
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1 mM	2 µl
deio. H <sub>2</sub> O			X µl
			ad 100 µl

## Anhang

---

Tab. B. 13: Temperaturprogramm der ersten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

	95 °C	5 min
15x	→ 95 °C	30 s
	56 °C	30 s
	68 °C	30 s
	68 °C	5 min
	4 °C	Lagerung

Tab. B. 14: Zusammensetzung der zweiten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

Komponente	Konz. Stock	Konz. final	Volumen Stock
Template (PCR-Produkt der 1. PCR)	?	?	16 µl
Platinum PFX Polymerase	2,5 U/µl	2 U/100 µl	6,4 µl
10 x PFX Reaction Puffer	10 x	1 x	80 µl
dNTP-Mix	je 10 mM	je 0,2 mM	16 µl
Primer-Mix (Selex-F + Selex-R-bio)	je 10 µM	je 0,5 µM	40 µl
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1 mM	16 µl
deio. H <sub>2</sub> O			625,6 µl
			800 µl

Tab. B. 15: Temperaturprogramm der zweiten PCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

	95 °C	5 min
25x	→ 95 °C	30 s
	56 °C	30 s
	68 °C	30 s
	68 °C	5 min
	4 °C	Lagerung

### B.6.5 Isolation einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus PCR-Produkten

Die Trennung der komplementären Stränge erfolgt durch Einsatz von Streptavidin-Magnetpartikeln (Dynabeads M-280 Streptavidin von Thermo Scientific). Zunächst werden 700  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt der zweiten PCR mit 175  $\mu\text{l}$  Salzlösung (vgl. Tab. B. 11 auf S. 130) und 2 mg Streptavidin-Magnetpartikeln gemischt und für 10 min bei 20 °C im Rotator inkubiert (20 Upm). Die Magnetpartikel werden 3 x 1 min mit 1 ml SELEX-PBS-T gewaschen. Danach werden 100  $\mu\text{l}$  einer 100 mM Natronlauge auf die Magnetpartikel gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 20 °C wird der Überstand über den Magnetpartikeln, der nun die einzelsträngigen Aptamerkandidaten enthält, entnommen und mit 110  $\mu\text{l}$  Neutralisationslösung versetzt. Die so erzeugte Bibliothek an Aptamerkandidaten kann nun in die nächste Selektionsrunde eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### B.6.6 Automatisierter Selektionsschritt

Der automatisierte Selektionsschritt wird auf einem KingFisher Magnetic Particle Processor durchgeführt. Für die automatisierte Selektion müssen vor Beginn der Prozedur alle Lösungen in einer 96-Well-Platte vorgelegt werden (vgl. Tab. B. 16) (vgl. Tab. B. 11 auf S. 130).

Tab. B. 16: Automatisierter Selektionsschritt

Reihe A	100 $\mu\text{l}$	Target-Magnetpartikel in Selektionspuffer
Reihe B	100 $\mu\text{l}$	Aptamerkandidaten in Selektionspuffer
Reihe C	100 $\mu\text{l}$	Selektionspuffer
Reihe D	100 $\mu\text{l}$	Selektionspuffer
Reihe E	100 $\mu\text{l}$	Elutionspuffer
Reihe F	100 $\mu\text{l}$	dd <sub>2</sub> O

Die simulierte automatisierte Selektion beginnt damit, dass die Magnetpartikel aus Reihe A aufgenommen und in Reihe B freigesetzt werden. Nach einer Inkubation von 2 h bei langsamen Rütteln (*slow*) werden die Magnetpartikel erneut aufgenommen und jeweils in den Reihen C und D gewaschen. Dabei werden die Magnetpartikel kurz freigesetzt und nach einer Inkubation von 10 s erneut aufgenommen. Die Elution der gebundenen Aptamerkandidaten erfolgt hier über 1 h kompetitiv durch 1 M Imidazol im Basispuffer.

Für die Automatisierung einer realen Selektion sollte das Protokoll leicht abgewandelt werden. So sollte die Inkubationszeit der Waschschrte erhöht und ein dritter Waschschrte eingeführt werden. Zudem sollte die Elution nicht kompetitiv erfolgen, sofern dies nicht für die spätere Anwendung des Aptamers gewünscht ist. So könnten beispielsweise die Target-Magnetpartikel mit den gebundenen Aptamerkandidaten nach den Waschschrten einfach in SELEX-PBS abgelegt werden und anschließend der Hitzedenaturierung zugeführt werden.

### B.7 Optimierte SELEX

Die optimierte SELEX stellt eine Weiterentwicklung der minimalen SELEX dar.

#### B.7.1 Puffer für die optimierte SELEX

Die optimierte SELEX verwendet für die Selektionsschrte ein modifiziertes Puffersystem (vgl. Tab. B. 17), sodass während der Lagerung keine schwerlöslichen Verbindungen ausfallen können.

Tab. B. 17: Zusammensetzung der Puffer für die optimierte SELEX

Elutionslösung	25 mM Tris-HCl, pH 7,4
Neutralisationslösung	100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
opt. Selektionspuffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,4
SELEX-PBS-T	50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5
STV-Puffer	25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4

### B.7.2 Vorbereitungen zur Selektion

Die Vorbereitungen zur Selektion in der optimierten SELEX laufen analog zu denen der minimalen SELEX (siehe: *Vorbereitungen zur Selektion* auf S. 130). Vor dem Selektionsschritt wird die Bibliothek der Aptamerkandidaten in 100 µl optimierten Selektionspuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wird die Bibliothek auf 4 °C abgekühlt und es werden 1 ml optimierter Selektionspuffer zugegeben. Parallel werden die auf Magnetpartikeln immobilisierten Zielmoleküle durch Waschen der Magnetpartikel mit 1 ml optimiertem Selektionspuffer für die Selektion vorbereitet.

### B.7.3 Selektionsschritt

Der Selektionsschritt ist identisch zum Selektionsschritt der minimalen SELEX (siehe: *Selektionsschritt* auf S. 131).

### B.7.4 Amplifikation der Aptamerkandidaten mittels Emulsions-PCR

Die Amplifikation der eluierten Aptamerkandidaten erfolgt in zwei Emulsions-PCRs. Die EmulsionsPCR basiert auf der „regulären“ Amplifikation der Aptamerkandidaten (siehe: *Amplifikation der Aptamerkandidaten* auf S. 135) und der Methode zur Emulsifikation nach Diehl *et. al* <sup>(88)</sup>. Die organische Phase zur Emul-

## Anhang

---

sifikation der wässrigen Phase besteht dabei aus 73 % (v/v) Tegosoft DEC, 20 % (v/v) Mineralöl und 7 % (v/v) ABIL WE09. Die maximale Eingangsmenge an Aptamerkandidaten in die erste EmulsionsPCR ist 100 fmol. Für eine EmulsionsPCR werden 200  $\mu\text{l}$  wässrige PCR-Phase (vgl. Tab. B. 18) und 400  $\mu\text{l}$  organische Phase mit einem Rührfisch ( $3 \times 8 \text{ mm}$ ) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 40 s bei 30 Hz in einer Schwingmühle MM 400 (Retsch) emulgiert. Anschließend wird die Emulsion für die Reaktion (vgl. Tab. B. 19) in Aliquots mit je 50  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Die Optimierung dieses Protokolls wurde vorab veröffentlicht <sup>(89)</sup>.

Tab. B. 18: Zusammensetzung der wässrigen Phase der EmulsionsPCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

Komponente	Konz. Stock	Konz. final	Volumen Stock
Template (Eluat aus Selektionsschritt)	?	?	max. 90 $\mu\text{l}$
Platinum PFX Polymerase	2,5 U/ $\mu\text{l}$	2 U/100 $\mu\text{l}$	1,6 $\mu\text{l}$
10 x PFX Reaction Puffer	10 x	1 x	20 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix	je 10 mM	je 0,2 mM	4 $\mu\text{l}$
Primer-Mix (Selex-F-Cy5 + Selex-R-bio)	je 10 $\mu\text{M}$	je 0,5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{l}$
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1 mM	4 $\mu\text{l}$
BSA	100 g·l <sup>-1</sup>	2 g·l <sup>-1</sup>	4 $\mu\text{l}$
deio. H <sub>2</sub> O			ad X $\mu\text{l}$
			ad 200 $\mu\text{l}$

Tab. B. 19: Temperaturprogramm der EmulsionsPCR zur Amplifikation von Aptamerkandidaten

	95 °C	5 min
23x	95 °C	30 s
	56 °C	30 s
	68 °C	30 s
	68 °C	5 min
	4 °C	Lagerung

Nach der ersten EmulsionsPCR müssen die amplifizierten Aptamerkandidaten aus der Emulsion isoliert werden. Die hier beschriebene Aufreinigung wurde aus der Literatur adaptiert <sup>(90)</sup>. Die Aufreinigung aus der Emulsion wird mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) und Isobutanol durchgeführt. Dazu werden 1 ml Isobutanol und 1 ml Bindepuffer „PB“ aus dem QIAquick PCR Purification Kit zu der Emulsion gegeben. Anschließend wird eine Zentrifugaleinheit des Kits nach und nach mit dem PCR-Puffer-Isobutanol-Gemisch geladen. Die weitere Aufreinigung erfolgt nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgt mit 2 × 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0). Nach der Elution wird die Konzentration an amplifizierten Aptamerkandidaten im gereinigten PCR-Produkt über die intrinsische Fluoreszenz des *sense*-Primers fluorometrisch bestimmt.

Die zweite EmulsionsPCR wird wie die erste EmulsionsPCR durchgeführt. Hier wird lediglich die Größe des Reaktionsansatzes verdoppelt, maximale Eingangsmenge in die zweite EmulsionsPCR sind 200 fmol. Die Aufreinigung aus dem EmulsionsPCR-Produkt erfolgt wie oben beschrieben. Wegen der größeren Menge an Emulsion werden hier jedoch 2 ml Isobutanol, 2 ml Bindepuffer „PB“ und zwei Zentrifugaleinheiten eingesetzt. Die Elution erfolgt analog mit 2 × 50 µl Elutionspuffer je Zentrifugaleinheit.

### B.7.5 Isolation einzelsträngiger Aptamerkandidaten aus gereinigten EmulsionsPCR-Produkten

Die Trennung der komplementären Stränge erfolgt wiederum durch Einsatz von Streptavidin-Magnetpartikeln (Dynabeads M-280 Streptavidin von Thermo Scientific). Zunächst werden 150 µl gereinigtes PCR-Produkt der zweiten Emulsions-PCR mit 1 ml STV-Puffer (vgl. Tab. B.10 auf S. 128) und 2 mg Streptavidin-Magnetpartikeln gemischt und für 10 min bei 20 °C im Rotator inkubiert (20 Upm). Die Magnetpartikel werden 3 x 1 min mit 1 ml SELEX-PBS-T gewaschen. Danach werden 100 µl einer 150 mM Natronlauge auf die Magnetpartikel gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 20 °C wird der Überstand über den Magnetpartikeln, der nun die einzelsträngigen Aptamerkandidaten enthält, entnommen und mit 160 µl Neutralisationslösung versetzt. Die so erzeugte Bibliothek an Aptamerkandidaten kann nun in der nächsten Selektionsrunde eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### C Material

#### C.1 Chemikalienliste

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
ABIL WE 09	Evonik
Aceton	VWR
Acetonitril	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix Rotiphorese Gel 40 % (37,5/1)	Roth
Agar (für Mikrobiologie)	Sigma-Aldrich
Agarose (für Elektrophorese)	Roth
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Betain	Sigma-Aldrich
BisTris	Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Fluka
Chloroform	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	Sigma-Aldrich
Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich
Diethylether	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Sigma-Aldrich

## Anhang

---

Ethylacetat	Sigma–Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma–Aldrich
Fluorescein (freie Säure)	Fluka
Formaldehyd-Lösung (36,5 %)	Sigma–Aldrich
Formamid	Sigma–Aldrich
Glukose	Sigma–Aldrich
Glycerin	Sigma–Aldrich
Glycin	Sigma–Aldrich
Harnstoff	Fluka
Hefeextrakt	Fluka
Hexan	Roth
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Fluka
Isobutanol	Roth
Isopropanol	Sigma–Aldrich
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma–Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma–Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma–Aldrich
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Roth
Kaliumhydroxid	Fluka
Kaliumphosphat	Sigma–Aldrich
Kobaltchlorid	Sigma–Aldrich
L-Rhamnose	Fluka
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat	Sigma–Aldrich
Methanol	Roth
Methansulfonsäure	Sigma–Aldrich
Mineralöl	Sigma–Aldrich
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka

## Anhang

---

Natriumacetat	Sigma–Aldrich
Natriumazid	Sigma–Aldrich
Natriumcarbonat	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat	Sigma–Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS) Lsg. 10 %	Sigma–Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumphosphat	Sigma–Aldrich
Natriumthiosulfat	Sigma–Aldrich
Natronlauge	AppliChem
N–Hydroxysuccinimid	Fluka
Nonidet–P40	Fluka
Poly(deoxyinosyl–deoxycytidyl)–Säure (poly(dI–dC))	Thermo Scientific
Salzsäure	Roth
Silbernitrat	Roth
Span 80	Sigma–Aldrich
Tegosoft DEC (Bis(2–ethylhexyl)carbonat)	Evonik
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma–Aldrich
Toluol	Riedel–de Haen
Tris–Base	Sigma–Aldrich
Triton X–100	Biorad
Trypton	Fluka
Tween 20	AppliChem
Tween 80	Sigma–Aldrich

### C.2 Kits und Reagenzien

#### **Aufreinigung**

HisTrap HP 5 ml column	GE Healthcare Life Sciences
HiTrap Q HP 1 ml column	GE Healthcare Life Sciences
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

#### **Magnetpartikel**

Chitin Magnetic Beads	NEB
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen
Dynabeads M-280 Tosylactivated	Invitrogen
Nuclease-Free Streptavidin Beads	BioMag

#### **PCR**

Dnase-freies Wasser	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix (je 100 mM)	Invitrogen
Ex Taq DNA Polymerase	TaKaRa
GoTaq DNA Polymerase	Promega
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	Qiagen
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Platinum Pfx DNA Polymerase	Thermo Scientific
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB

#### **Real Time PCR**

GoTaq Probe qPCR Master Mix	Promega
GoTaq qPCR Mastermix	Promega

### Gele + Färbung

6 x DNA Loading Dye	Fermentas
EvaGreen	Biotium
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Roti-GelStain	Roth
SYBR Green I DNA Gel Stain	Amresco
SYBR Green II RNA Gel Stain	Amresco
Unstained Protein Molecular Weight Marker (10-200 kDa)	Thermo Scientific

### Sonstiges

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100 x)	Thermo Scientific
Quant-iT OliGreen ssDNA reagent	Thermo Scientific

## C.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma IDT (Coralville, USA) synthetisiert (vgl. Tab. C.22). Das Design der SELEX-Bibliothek ebenso wie das Aptamer 6H7 wurden aus dem US-Patent US007329742 übernommen<sup>(77)</sup>. Das Oligonukleotid Selex-F-Cy5 und die 6H7-Hydrolysesonde mussten aufgrund ihrer Modifikationen vom Hersteller über eine HPLC gereinigt werden.



### C.4 Verbrauchsmittel

96-Well-Platte (optische Assays)	Sarstedt
Einmalpipetten (5; 10; 25 ml)	Corning
Einmalpipetten (20; 50 ml)	Sarstedt
Frischhaltefolie	aro
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt
Kryogefäße (1,6 ml)	Sarstedt
Pasteurpipetten	Brandt
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000; 5000 µl)	Brand
qPCR-Folie Microseal 'B' Film	Biorad
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Centri Star Corning
Reaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2; 5 ml)	Sarstedt
Spritzen (1; 5 ml)	Braun
Spritzenaufsatzfilter Minisart 0,22 µm	Sartorius
Sterilfilter für Medien: Filtropur L 0,2 S	Sarstedt
SuperPlate Skirted PCR Plate	Thermo Scientific
Tube-O-Dialyzer 4 kDa MEDI	Gbiosciences
Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin PES	Sartorius Stedim Biotech

### C.5 Geräteliste

Agarose GE	MUPID ONE Advance (GE healthcare)
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent
Autoklav	Systec V 150
Geldokumentation	Epson Perfection 1260 Photo INTAS Gel iX Imager
Inkubationsofen	Binder ED 53

## Anhang

---

Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000
Fluorospektrometer	Nanodrop ND-3300
PCR	Biorad iQ 5 multicolor Real-Time PCR Detection System Biorad iCycler
pH-Meter	Hanna Instruments HI 221
Photometer	Kontron instruments UVIKON 922
Pipette	2,5; 20; 100; 200; 1000; 5000 µl eppendorf research
Platereader	Thermo Labsystems Multiskan Spectrum
Reinstwasser	arium 611 (sartorius)
Rotator	Labnet Revolver
Magnetrührer	MR Hei-Mix L von Heidolph
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop IX50 von Olympus CKX 41 von Olympus
Wasserbad	memmert
FPLC	BioLogic DuoFlow and BioFrac Fraction Collector (Bio-Rad)
Magnetpartikel-Prozessor	KingFisher Magnetic Particle Processor
Schüttelkolben-Inkubator	B. Braun Ceromat BS-1
SDS-PAGE	SE 245 Dual Gel Caster EPS-301 (amersham biosciences) SE 260 Mighty Small II
Sicherheitswerkbank	Hera safe Type: KS 18
Ultraschallsonde	sartorius labsonic M
Schwingmühle	Retsch MM 400
Vibrationsmixer	eppendorf Thermomixer comfort IKA MS 3 basic IKA Vibrax basic IKA RCT basic VWR international 1719 EUR

Waagen	Chyo JL 180 Denver Instruments Germany TP 3302
Zentrifugen	eppendorf centrifuge 5415 R eppendorf centrifuge 5430 Heraeus Multifuge 3s

### C.6 Software

AlphaEase FC Version 6.0	Alpha Innotech
Bioanalyzer 2100 Expert Software B.02.09	Agilent
Graphpad Prism 6	Graphpad
iQ5 optical system software Version 2.1	Biorad
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Origin Pro 2018b	OriginLab

### C.7 Bakterien und Plasmide

#### C.7.1 Plasmide für His-Tag-Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide der His-Tag-Proteine stammen aus vorangegangenen Projekten <sup>(78)</sup> und wurden in dieser Arbeit weder erzeugt, noch modifiziert. Die Gene für die His-Tag-Proteine liegen jeweils auf dem Plasmid pJOE2792 (vgl. Abb. C. 3) und stehen unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Operons. Das Plasmid verfügt über eine  $\beta$ -Lactamase als Resistenzmarker.

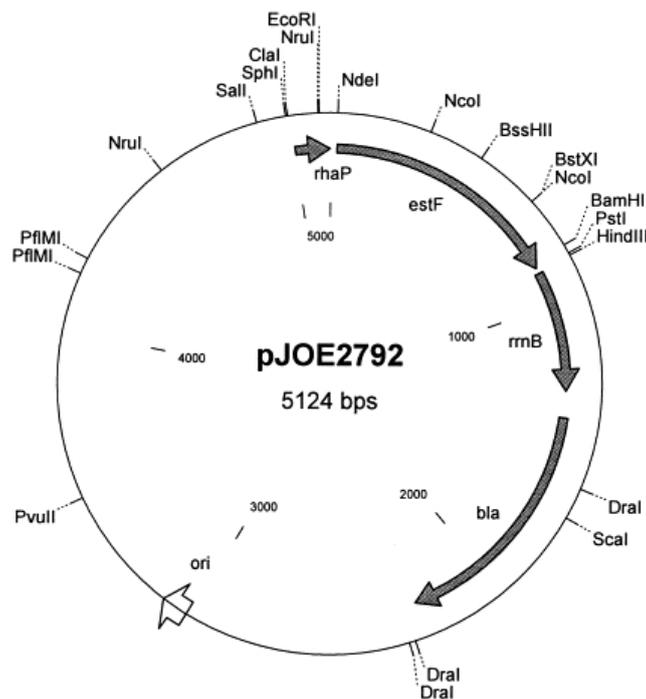


Abb. C. 3: Plasmid pJOE2792

### C.7.2 Plasmid zur Produktion der ATP7B N-Domäne

Das Gen für das Fusionsprotein der N-Domäne des ATP7Bs mit dem IMPACT-Tag liegt auf dem Plasmid pTYB12 (NEB) (vgl. Abb. C. 4) und steht dort unter der Kontrolle eines LAC-Promotors. Das Plasmid verfügt über eine  $\beta$ -Lactamase als Resistenzmarker und wurde von Amelie Stalke bereitgestellt <sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Nils von Neuhoff (ehemals Medizinische Hochschule Hannover (MHH), inzwischen Universität Duisburg-Essen / am Universitätsklinikum Essen)

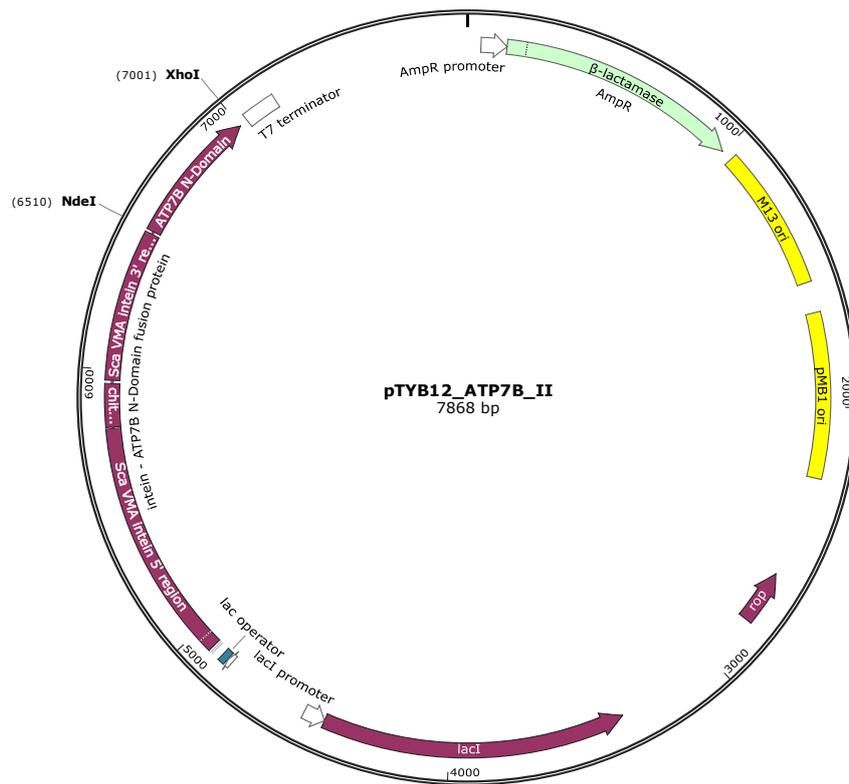


Abb. C. 4: Schematischer Aufbau des ATP7B-Plasmids

### C.7.3 Bakterielle Stämme

*E. coli* BL21 (DE3)

*E. coli* K12

## Betreute Abschlussarbeiten im Rahmen der Promotion

### **Bachelorarbeit von Zawadi Hellmann**

Titel: Analyse von Technologien zur Erzeugung von DNA-Einzelsträngen aus PCR-Produkten

Jahr: 2014

### **Masterarbeit von Roman Hilje**

Titel: Automation of an *in vitro* selection process

Jahr: 2015

## Publikationen

1)

**Martin Witt**, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl

Aptamer Microarrays – Current Status and Future Prospects

Microarrays 2015, 4, 115-132; doi: [10.3390/microarrays4020115](https://doi.org/10.3390/microarrays4020115)

2)

**Martin Witt**, Ngoc Linh Phung, Amelie Stalke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Nils von Neuhoff, Thomas Scheper

Comparing two conventional methods of emulsion PCR and optimizing of Tegosoft-based emulsion PCR

Eng. Life Sci. 2017, 17, 953–958; doi: [10.1002/elsc.201700047](https://doi.org/10.1002/elsc.201700047)

3)

Harshvardhan Modh, **Martin Witt**, Katharina Urmann, Antonina Lavrentieva, Ester Segal, Thomas Scheper, Johanna-Gabriela Walter

Aptamer-based detection of adenosine triphosphate via qPCR

Talanta 172 (2017) 199–205; doi: [10.1016/j.talanta.2017.05.037](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.037)

4)

Stefanie Thoms, **Martin Witt**, Rebecca Jonczyk, Thomas Scheper, Cornelia Blume  
Dynamic-hypoxic conditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and co-culturing with human umbilical vein endothelial cells favors endothelial network formation

submitted: 11-Jan-2019 in Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Martin Bernhard Witt  
Geburtsdatum: 17.04.1988  
Geburtsort: Oberhausen  
Nationalität: deutsch

## Beruflicher Werdegang

09/2016 - **Institut für Humangenetik**, Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
03/2018 Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Deutschland  
06/2013 - **Institut für Technische Chemie**, Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
07/2016 Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland  
08/2011 - **Institut für Technische Chemie**, Wissenschaftliche Hilfskraft  
05/2012 Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland  
06/2009 - **Institut für Technische Chemie**, Wissenschaftliche Hilfskraft  
08/2009 Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland

## Studium

seit **Leibniz Universität Hannover, Promotion Chemie**  
06/2013 Hannover, Deutschland  
11/2010 - **Leibniz Universität Hannover, Master of Science: Life Science**  
04/2013 Hannover, Deutschland  
10/2007 - **Leibniz Universität Hannover, Bachelor of Science: Life Science**  
11/2010 Hannover, Deutschland

## Schulische Ausbildung

1998 - **Sophie-Scholl-Gymnasium**, Oberhausen  
06.2007 Abschluss: Abitur  
1994 - **Schwarze-Heide-Schule**, Oberhausen  
1998