

Neue Analyse- und Detektionsmethoden in der Microarray-Technologie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chem. Miriam Lübbecke
geboren am 27.7.1984, in Neustadt a. Rbge

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. Cornelia Kasper

Tag der Promotion: 09. Dezember 2011

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht schon als Master-, Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Dezember 2011

Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Professor Thomas Scheper für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe sowie seiner stets freundlichen Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper für die Übernahme des Korreferats.

Bei Dr. Frank Stahl möchte ich mich für die fachliche Unterstützung sowie die nette und entspannte Zeit im Büro herzlich danken.

Johanna Walter danke ich sehr für ihre tolle fachliche und menschliche Unterstützung sowie für die netten Gespräche im und außerhalb des Labors.

Martin Pähler möchte ich für seine umfangreiche Hilfestellungen im Labor und die tollen „Um-die-Ecke-gedacht“-Pausen danken.

Martina Weiss danke ich besonders für ihre Hilfe und Ratschläge bei diversen Versuchsproblemen und fürs Posterdrucken.

Dr. Sascha Beutel und Frau Angelika Behnsen danke ich sehr für die Hilfestellungen bei der Verwaltung von Projektgeldern.

Für die tolle Hilfe im Labor möchte ich mich bei Guohong Zhu, Ki-duk Seo, Martin Witt sowie Anja Klenge bedanken.

Meinen gesamten Kollegen am TCI danke ich für die besondere Zeit am TCI. Ich fühlte mich immer sehr wohl und hatte sehr, sehr viel Spaß mit Euch allen! Danke für die vielen netten Treffen außerhalb der Arbeitszeit.

Zusammenfassung

Sowohl in der Proteom-Forschung als auch in der biotechnologischen Proteinproduktion sind zuverlässige Methoden für den Nachweis von Proteinen unverzichtbar. Microarrays stellen aufgrund ihrer hohen Parallelisierbarkeit eine bedeutende Technik der Proteinanalytik dar. Die bisher entwickelten Protein-Microarrays basieren in erster Linie auf Antikörpern, welche das Targetprotein erkennen und binden. Eine vielversprechende Alternative zu Antikörpern sind Aptamere. Aptamere sind einzelsträngige DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide und können gegen unterschiedlichste Moleküle selektiert werden, wobei sie bei ähnlicher Spezifität und Affinität eine wesentlich höhere Stabilität als Antikörper aufweisen.

Um die Entwicklung neuer, alternativer Detektionsmethoden in der Protein-Microarray-Technologie voranzutreiben, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern Aptamere als Fänger- und Detektionsmoleküle auf Microarrays geeignet sind. Hierbei wurden aptamerbasierte Microarrays zur Detektion von His-getagten Proteinen, Antikörpern (Immunglobulinen) sowie einem humanen Wachstumsfaktor (VEGF₁₆₅) hergestellt und charakterisiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Bereitstellung der verwendeten Proteine. Während die Immunglobuline ausschließlich kommerziell erworben wurden, sind die His-getagten Proteine rekombinant produziert und aufgereinigt worden. Das VEGF₁₆₅ wurde nach Klonierung des entsprechenden Gens überexprimiert und aufgereinigt.

Die Entwicklung der aptamerbasierten Microarrays fand zunächst mit anti His-Tag-Aptameren statt. Anschließend konnten die optimierten Protokolle erfolgreich auf die anti F_c-Fragment- und anti VEGF₁₆₅-Aptamere übertragen und angepasst werden. Im *Forward-Phase*-Format wurde die Funktionalität der Aptamere auf verschiedenen Oberflächen getestet. Es konnte gezeigt werden welche Eigenschaften, z.B. die Länge des molekularen Spacers zwischen Aptamer und Oberfläche, die Proteinbindung maßgeblich beeinflussen.

Darüber hinaus wurden fluoreszenzmarkierte Aptamere als Detektionsmoleküle im *Reverse-Phase*-Format implementiert. Aufgrund der hohen Spezifität dieses Assays konnte eine Proteindetektion aus *E. coli*-Zelllysaten realisiert werden. Darüber hinaus wurde ein microarraybasierter Sandwich-Assay zur Detektion von humanem F_c-Fragment entwickelt.

Schlagwörter: Protein-Microarray, Aptamer, Oberflächenmodifizierung

Abstract

Reliable methods for protein detection are essential in proteomics and biotechnological protein production. The possibility of parallel analysis of many samples makes microarrays an important tool in protein analysis. Until now, primarily protein-microarrays based on antibodies as capture molecules have been developed. A strong alternative is the application of aptamers on protein microarrays. Aptamers are single stranded DNA or RNA oligonucleotides able to bind different kinds of molecules. They exhibit a higher stability than antibodies and show similar specificities and affinities for protein binding.

The present work supports the development of new methods for protein detection with aptamers utilized as capture and detection molecules. Aptamer-based microarrays for the detection of His-tagged proteins, antibodies (immunoglobulines) and a human growth factor (VEGF₁₆₅) were produced and characterized. Therefore a main part of this work deals with the production and purification of the required target proteins. The immunoglobulines were obtained commercially, but the His-tagged proteins were produced in *E. coli* followed by purification. The gene of VEGF₁₆₅ was cloned and the growth factor was overexpressed and purified.

At first, the development of the aptamer microarrays was performed with anti His-Tag aptamers. After optimization the protocols were successfully transferred and adapted to the anti F_c-Fragment- and anti VEGF₁₆₅- aptamers. The functionality of the aptamers in forward phase format was tested on various surfaces. As a result, the properties (e.g. length, of the molecular spacer between aptamer and surface) that affect protein binding significantly were determined.

Additionally fluorescent-labeled aptamers were implemented as detection molecules on reverse phase microarrays. As a result of the high specificity of this assay, the analysis of proteins in complex samples, e.g. cell lysate, was realized. In case of the anti F_c-aptamers a microarray-based sandwich assay was developed finally.

Key words: protein microarray, aptamer, modification of surfaces

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	- 10 -
1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	- 12 -
1.1 Aptamere	- 12 -
1.1.1 Aptamerstrukturen und Strukturaufklärung.....	- 13 -
1.1.2 Bindungsmechanismen.....	- 15 -
1.1.3 Selektion von Aptameren.....	- 19 -
1.1.3.1 Konventionelles SELEX-Verfahren.....	- 19 -
1.1.3.2 MonoLEX.....	- 21 -
1.1.3.3 FluMag-SELEX.....	- 22 -
1.1.4 Anwendungen von Aptameren.....	- 22 -
1.1.4.1 Aptasensoren.....	- 23 -
1.2 Protein-Microarrays	- 26 -
1.2.1 Microarray- Formate.....	- 28 -
1.2.2 Oberflächen und Immobilisierungsstrategien.....	- 30 -
1.2.2.2 Substrate zur Immobilisierung von Oligonukleotiden.....	- 31 -
1.2.2.1 Substrate zur Immobilisierung von Proteinen.....	- 31 -
1.2.3 Aptamerbasierte Microarrays.....	- 33 -
2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	- 37 -
2.1 Verwendete Aptamere	- 37 -
2.1.1 Aptamere gegen Histidine-Tag.....	- 39 -
2.1.2 Aptamere gegen humanes F _c -Fragment.....	- 40 -
2.1.3 Aptamere gegen <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF).....	- 41 -
2.2 Bereitstellung der Targetproteine	- 43 -
2.2.1 His-getaggte Proteine.....	- 43 -
2.2.1.1 Produktion und Aufreinigung.....	- 44 -
2.2.1.2 Cy3-Markierung.....	- 45 -
2.2.2 Immunglobulin G (IgG).....	- 45 -
2.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	- 46 -
2.2.3.1 Rekombinante Produktion von VEGF ₁₆₅	- 47 -
2.2.3.2 Klonierungsstrategien.....	- 49 -
2.2.3.3 Expression von VEGF ₁₆₅	- 53 -

2.2.3.4	Aufreinigung von VEGF ₁₆₅	- 57 -
2.3	Herstellung und Auswertung der Microarrays	- 61 -
2.3.1	Einfluss der Spotting-Technologie	- 62 -
2.3.1.1	Kontakt-Spotter	- 62 -
2.3.1.2	Kontaktfreier Spotter	- 62 -
2.3.2	Scannen der Microarrays	- 64 -
2.3.3	Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff.....	- 64 -
2.3.4	Auswertung der Microarrays	- 64 -
2.4	Entwicklung und Optimierung der Aptamer-Microarrays	- 65 -
2.4.1	Detektion His-getaggtter Proteine.....	- 66 -
2.4.1.1	<i>Forward-Phase-Assay</i>	- 66 -
2.4.1.2	<i>Reverse-Phase-Assay</i>	- 79 -
2.4.1.3	Zusammenfassung: Detektion His-getaggtter Proteine.....	- 89 -
2.4.2	Detektion von Immunglobulinen	- 91 -
2.4.2.1	<i>Forward-Phase-Assay</i>	- 92 -
2.4.2.2	<i>Reverse-Phase-Assay</i>	- 96 -
2.4.2.3	<i>Sandwich-Assay</i>	- 103 -
2.4.2.4	Zusammenfassung: Detektion von Immunglobulinen	- 108 -
2.4.3	Detektion von VEGF ₁₆₅	- 109 -
2.4.3.1	<i>Reverse-Phase-Assay</i>	- 109 -
2.4.2.3	Zusammenfassung: Detektion von VEGF ₁₆₅	- 117 -
3	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	- 119 -
	ANHANG	- 123 -
A	VERWENDETE MATERIALIEN	- 124 -
A.1	Chemikalien	- 124 -
A.2	Kits	- 127 -
A.3	Puffer und Lösungen	- 127 -
A.4	Biomoleküle	- 128 -
A.4.1	Aptamere	- 128 -
A.4.2	Antikörper	- 128 -
A.4.3	Enzyme/Proteine	- 129 -
A.4.4	Plasmide	- 129 -
A.4.5	Sonstiges	- 130 -
A.4.6	PCR-Primer und Sequenzen.....	- 130 -

A.5 Microarray-Oberflächen.....	- 131 -
A.6 Verbrauchsmaterialien.....	- 131 -
A.7 Geräte	- 132 -
A.8 Software	- 133 -
B VERWENDETE METHODEN	- 135 -
B.1 Allgemeine Methoden	- 135 -
B.1.1 PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase.....	- 135 -
B.1.2 PCR mit <i>Pfu</i> -Polymerase	- 136 -
B.1.3 Herstellung von Agarplatten	- 136 -
B.1.4 Herstellung von Gefrierkulturen	- 137 -
B.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	- 137 -
B.1.6 Plasmidpräparation.....	- 137 -
B.1.7 Gelextraktion.....	- 138 -
B.1.8 Restriktionsverdau.....	- 138 -
B.1.9 Ligation	- 138 -
B.1.10 Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	- 138 -
B.1.11 Kolonie-PCR.....	- 139 -
B.1.12 SDS-PAGE.....	- 139 -
B.1.13 Western-Blot	- 140 -
B.2 Bereitstellung der Targetproteine	- 141 -
B.2.1 His-Tag-Proteine	- 141 -
B.2.2 VEGF ₁₆₅	- 144 -
B.3 Herstellung der Microarray-Oberflächen	- 150 -
B.3.1 Aminofunktionalisierte Oberflächen.....	- 151 -
B.3.2 Epoxyfunktionalisierte Oberflächen	- 151 -
B.3.3 Aldehydfunktionalisierte Oberflächen	- 151 -
B.3.4 Herstellung der aminofunktionalisierten Linker-Systeme	- 152 -
B.3.5 Einführung von Epoxygruppen auf aminofunktionalisierten Oberflächen	- 153 -
B.3.6 Einführung von Aldehydgruppen auf aminofunktionalisierten Oberflächen.....	- 153 -
B.4 Microarray-Experimente	- 154 -
B.4.1 Forward-Phase.....	- 154 -
B.4.2 Reverse-Phase	- 156 -
B.4.3 Sandwich	- 157 -
C ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 159 -

D LITERATURVERZEICHNIS	- 161 -
E LEBENSLAUF.....	- 172 -
F VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSBEITRÄGE	- 173 -

Einleitung und Aufgabenstellung

Bereits Mitte der 90er wurden die ersten DNA-Microarrays publiziert [1, 2]. In den darauffolgenden Jahren hat sich diese Technologie zur Genexpressionsanalyse enorm weiter entwickelt. Neben dem Anstieg des Angebots kommerzieller Biochips ist ebenso das verfügbare Equipment zur Herstellung und Auswertung von DNA-Microarrays expandiert. Analog dazu wurden immer mehr Publikationen im Bereich der Microarray-Technologie verzeichnet. Der große Vorteil von Biochips liegt an dem möglichen Hochdurchsatz-Screening, der Parallelisierbarkeit, der Miniaturisierbarkeit sowie der Automatisierung.

Um neben der Untersuchung des vorliegenden Expressionslevels der Gene eines Organismus auch eine qualitative sowie quantitative Aussage über die translatierten Proteine zu erhalten, wurde die Implementierung entsprechender Microarrays zur Detektion von Proteinen in komplexen Proben vorangetrieben. Die Entwicklung dieser Protein-Assays zur Detektion von Proteinen in komplexen Proben im Microarray-Format verlief wesentlich langsamer als bei den DNA-Microarrays [3]. Ein konventioneller Protein-Microarray besteht aus einem Glasträger mit immobilisierten Antikörpern als Fängermoleküle. Im Vergleich zu den relativ robusten Nukleinsäuren weisen Proteine neben der aufwändigeren Herstellung und Aufreinigung eine komplexe Struktur auf, welche nach dem Koppeln an den Glasträger ihre Konformation und damit ihre Bindungseigenschaft verliert. Die größte Herausforderung bestand daher zunächst in der Entwicklung eines geeigneten Materials zur Protein-Immobilisierung auf Microarrayslides. Die höchsten Bindungskapazitäten unter Erhalt der nativen Konformation können mit dreidimensionalen Substraten, wie z.B. Nitrocellulose oder Hydrogelen erzielt werden [4-7]. Aufgrund der geringen Stabilität der immobilisierten Antikörpern und somit begrenzten Lagerungsmöglichkeit ist eine umfangreiche kommerzielle Vermarktung dieser Protein-Biochips schwierig [8].

Eine interessante und vielversprechende Alternative stellt die Verwendung von Aptameren als Fängermoleküle auf Protein-Microarrays dar. Bei Aptameren handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide, welche spezifische Bindungen mit einer Vielzahl an Molekülen eingehen. Aptamere sind wesentlich stabiler als Antikörper und können nach der Targetbindung wieder regeneriert werden. Zudem lassen sie sich leicht chemisch modifizieren, was einerseits die Immobilisierung der Aptamere erleichtert und z.B. nach einer Fluoreszenzmarkierung auch ihren Einsatz als Detektionsmolekül ermöglicht. Mithilfe des

SELEX-Verfahrens zur *in vitro*-Selektion von Aptameren, können diese gegen eine Vielzahl von Molekülen generiert werden, was beispielsweise die Entwicklung von Microarrays zur Detektion von Wirkstoffen oder Toxinen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Dissertation sollen neue, robustere und empfindlichere Methoden zur Detektion von Proteinen mithilfe von Aptamer-Microarrays entwickelt werden. Die bisherigen, publizierten Arbeiten auf dem Gebiet der Aptamer-Microarray-Technologie lieferten dabei den Grundstein für den Aufbau von aptamerbasierten *Forward-Phase*-, *Reverse-Phase*- und Sandwich-Formaten [9-12]. Zur Etablierung und Optimierung der Methoden wurde zunächst auf ein Aptamer zur Detektion verschiedener His-getaggtter Proteine zurückgegriffen. Anschließend kamen ebenfalls Aptamere gegen humanes IgG und VEGF₁₆₅ zum Einsatz. Um langfristig gesehen eine vergleichsweise kostengünstige Produktion des VEGF in *E. coli* zu realisieren wurde in dieser Arbeit eine Klonierung des Gens aus dem Vektor einer CHO-Zelllinie in einem geeigneten *E. coli*-Expressionsvektor durchgeführt und eine Aufreinigung durchgeführt.

Um ihr Zielmolekül binden zu können, müssen sich die Aptamere in eine spezielle dreidimensionale Struktur falten. Aus diesem Grund stellt bei der Entwicklung von Aptamer-Chips die Immobilisierung der Aptamere auf festen Oberflächen die größte Herausforderung dar. Neben der Untersuchung verschiedenster Immobilisierungsstrategien von Aptameren im *Forward-Phase*-Format soll in dieser Arbeit zudem geklärt werden, ob Aptamere neben ihrer Funktion als Fängermoleküle auf Microarrays auch im *Reverse-Phase*-Format zur Detektion eingesetzt werden können.

Im Bereich der antikörperbasierten Microarray-Technologie zeigen Sandwich-Assays eine weitaus höhere Sensitivität und Spezifität als die anderen Formate [13, 14]. Daher wurde mithilfe der gewonnenen Informationen über das Bindungsverhalten der Aptamere die Entwicklung eines Aptamer-Sandwich-Assays auf Basis von fluoreszenzmarkierten Aptameren vorangetrieben.

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Aptamere

Aptamere sind synthetische einzelsträngige Oligonukleotide, bestehend aus RNA- oder DNA-Abschnitten mit einer Länge von 25 bis 80 Nukleotiden, welche unter Ausbildung einer dreidimensionalen Konformation verschiedenste Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können [15-18]. Das Wort Aptamer leitet sich von dem lateinischen Wort *aptus* (passend, geeignet) und dem griechischen Wort *meros* (Teil) ab.

Bereits in den 1980er Jahren wurden natürlich vorkommende, einzelstränge RNA-Moleküle mit enzymatischen Eigenschaften, sogenannte Ribozyme, entdeckt, welche analog zu Enzymen chemische Reaktionen in Zellen katalysieren [19]. Wenige Jahre später war es mithilfe der damals neuartigen PCR-Technik möglich, jede beliebige Desoxyribonukleotidsequenz *in vitro* zu erzeugen, woraufhin auch die Synthese funktioneller Oligonukleotide vorangetrieben wurde. Neben den schon bekannten Ribozymen, wurden auf diese Weise die Aptamere als vielversprechende Bindungsmoleküle entdeckt. In den letzten zehn Jahren wurden Aptamere gegen eine Vielzahl an Bindungspartnern entwickelt, unter anderem gegen Nukleotide [20, 21], sowie diverse Peptide und Proteine [22, 23], aber auch organische Moleküle [15, 24], anorganische Ionen [25, 26] und sogar ganze Zellen [27, 28] können von Aptameren spezifisch erkannt und gebunden werden. Der große Vorteil von Aptameren als Fängermoleküle in biochemischen Nachweis-Assays liegt im Vergleich zu Antikörpern in ihrer hohen chemischen Stabilität, der relativ einfachen Entwicklung mittels SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) und der niedrigen Immunogenität. Desweiteren können Aptamere leicht mit Farbstoffen modifiziert werden, was im Bereich der Analytik eine entscheidende Rolle spielt. Neben der Anwendung als sogenannte „Detectamere“ finden Aptamere auch Einsatzmöglichkeiten als Therapeutika oder als Affinitätsmoleküle in der Aufreinigung.

Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften von Aptameren und ihre Herstellung genauer erläutert. Ferner werden verschiedene Anwendungen vorgestellt, in denen Aptamere bereits eingesetzt werden.

1.1.1 Aptamerstrukturen und Strukturaufklärung

Die Erkennung und Bindung von Molekülen (Targets) durch Aptamere basiert auf der speziellen dreidimensionalen Aptamerstruktur. Es werden dabei zwei Strukturelemente unterschieden: sekundäre und tertiäre Elemente.

Die Sekundärstrukturen bestehen aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zueinander komplementären Nukleinbasen und sind in erster Linie von der Sequenz, also der Nukleotidabfolge des Aptamers abhängig. Bekannte Formen sind z.B. *loops*, *mismatches* oder *junctions* (Abbildung 1.1) [29, 30], aber auch *pseudoknots*. Ein *pseudoknot* entsteht, wenn sich Basen außerhalb des *stem-loops* mit Basen innerhalb des *loops* paaren und dadurch eine zweite *stem-loop*-Struktur ausgebildet wird (Abbildung 1.2).

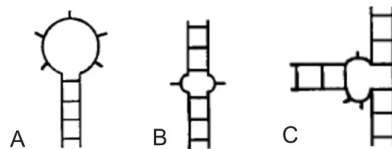


Abbildung 1.1 Darstellungen möglicher Sekundärstrukturelemente von Aptameren. (A) *stem-loop*, (B) *mismatch*, (C) *three-way junction* [31].

Die weitaus komplexeren Tertiärstrukturen bilden sich durch Wechselwirkungen von vorhandenen Sekundärstrukturelementen aus [29, 31]. Tinocco *et al.* (1999) behaupten, dass bei der Formierung tertiärer Strukturen die Sekundärelemente nicht verändert werden. Nur Bereiche mit geringer Stabilität, wie z.B. *kissing-hairpins*, werden durch die Wechselwirkungen beeinflusst und verändert [29].

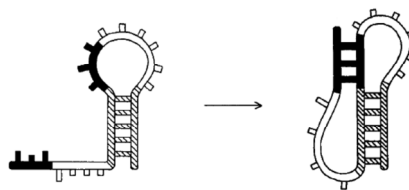


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Entstehung eines *pseudoknots* [31].

Verschiedene Metallionen können sekundäre- und tertiäre Oligonukleotidstrukturen aufgrund von Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphatrückgrat der Nukleotidsequenz stabilisieren [29, 30, 32]. Die Bindungsstellen der Ionen werden *metal binding sites* genannt. In Sekundärstrukturen sind diese Bindungsbereiche „vorgefaltet“, d.h. die Struktur existiert auch ohne die Anwesenheit von Metallionen und ändert sich auch nicht

bei Anwesenheit dieser. Andere *metal binding sites* bilden sich während der Ausbildung der Tertiärstrukturen. In einigen Fällen können tertiäre Strukturelemente nur in Anwesenheit der Metallionen existieren [29].

Bei der Formierung von *kissing-hairpins* werden beispielsweise Magnesiumionen gebunden [33], wohingegen monovalente Ionen die Ausbildung von G-Quadruplexstrukturen begünstigen. Dabei handelt es sich um viersträngige inter- oder intramolekulare Strukturen, bestehend aus einer quadratischen Anordnung von Guaninmolekülen. Bei Aptamern können G-Quadruplexe auftreten, wenn diese einen hohen Anteil an Guanin aufweisen [34]. Das in dieser Arbeit verwendete Aptamer V7t1 gegen VEGF₁₆₅ weist eine G-Quadruplexstruktur auf (siehe Abschnitt 2.1.3). Nonaka *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Bindung des VEGF₁₆₅ an V7t1 bei Anwesenheit von Kaliumionen besonders begünstigt wird [34].

Der große Vorteil der metallionenabhängigen Strukturausbildung ist die Möglichkeit einer einfachen Regenerierung des Aptamers, d.h. Abspaltung des Targetmoleküls durch Entfernung der Ionen, z.B. bei divalenten Kationen mit chelatisierenden Reagenzien wie EDTA.

Um Informationen über die Faltungsmöglichkeiten eines Aptamers und somit über die Stabilität und Ionenabhängigkeit der Struktur zu erhalten, ist eine Strukturvorhersage hilfreich. Zur Berechnung der Sekundärstrukturen von einzelsträngigen Oligonukleotiden stehen viele frei zugängliche Programme, wie z.B. Mfold¹, RNA-fold² oder Kinefold³ zur Verfügung. Die Programme basieren dabei auf verschiedenen mathematischen Faltungs-Algorithmen, die anhand der Nukleotidsequenzen der DNA- oder RNA- Stränge mögliche Sekundärstrukturen über die Berechnung der Änderung der Freien Energie (ΔG) bestimmen [35, 36]. Während bei RNA-fold und Kinefold neben der Sequenz keine weiteren Parameter in die Berechnung eingehen, können mit Mfold auch die Temperatur und die im Umfeld des Aptamers vorherrschende Natrium- und Magnesiumionenkonzentration berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde Mfold in dieser Arbeit zur Strukturvorhersage der verwendeten Aptamere eingesetzt (siehe Abschnitt 2.1).

Mfold basiert auf der Verwendung eines von Michael Zuker entwickelten Algorithmus [37]. Die Struktur, bei welcher die Änderung der Freien Energie am stärksten negativ ist, wird

¹ <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>

² <http://rna.tbi.univie.ac.at/>

³ <http://kinefold.curie.fr/>

automatisch als die stabilste und somit wahrscheinlichste Form angesehen. Generell ist jedoch zu bedenken, dass je nach äußeren Bedingungen (Puffer, Temperatur, Ionenkonzentrationen, pH-Wert, etc.) verschiedene Aptamerstrukturen im Gleichgewicht nebeneinander vorliegen können [29].

Die Bestimmung der genauen dreidimensionalen Struktur von funktionellen Nukleinsäuren ist hilfreich zur Untersuchung von Aptamer-Target-Wechselwirkungen. Ebenso erleichtern die Kenntnisse über die Struktur der Bindungsregionen die Entwicklung neuer Aptamere. Bisher können dreidimensionale Aptamerstrukturen nur über experimentelle Messungen mithilfe der Röntgendiffraktometrie oder spezieller NMR-spektroskopischer Methoden zuverlässig bestimmt werden [29, 38-40]. Das strukturell wohl am besten charakterisierte Aptamer ist das DNA-Aptamer gegen Thrombin [41].

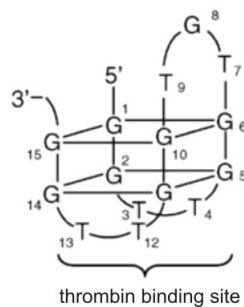


Abbildung 1.3 Darstellung der dreidimensionalen Quadruplexstruktur des anti Thrombin-Aptamers [41].

Durch ^1H -NMR-Spektroskopie konnte die dreidimensionale Struktur dieses Aptamers vollständig aufgeklärt werden. Die Struktur besteht aus einer Quadruplexstruktur mit zwei G-Quartetts, welche über zwei TT-loops und einen TGT-loop verbunden sind (Abbildung 1.3) [41-43].

1.1.2 Bindungsmechanismen

Die Bindung von Aptamer und Target basiert auf Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, sowie Stapelwechselwirkungen zwischen π -Systemen [44, 45].

Beim einfachsten Fall von Aptamer-Target-Bindung ist die Struktur des Aptamers schon in Abwesenheit des Targets komplett korrekt geformt. Das Target wird analog zu Enzym-

Substrat-Komplexen nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ (*key-lock*-Mechanismus) gebunden. Bekannt ist dies für das zuvor beschriebene DNA-Aptamer (siehe Abschnitt 1.1.1), welches Thrombin bindet [46]. Der Bindungsmechanismus konnte in diesem Fall aus NMR-spektroskopischen Messungen abgeleitet werden.

Dem Großteil der Aptamere liegt ein anderer Bindungsmechanismus zugrunde. Das Aptamer weist in Abwesenheit des Zielmoleküls bereits „vorgefaltete“ Strukturelemente auf, bildet die endgültige Struktur aber erst während des Bindungsvorgangs aus. Dieser Bindungsmechanismus wird, ebenfalls in Anlehnung an die Enzymnomenklatur, als adaptive Bindung, bzw. *induced-fit* bezeichnet [47]. *Induced-fit*-Mechanismen konnten mithilfe der beschriebenen Untersuchungsmethoden für die meisten bekannten Aptamer-Target-Komplexe bestätigt werden. Ein gutes Beispiel dafür ist ein Aptamer gegen Theophyllin [48]. Sobald das Theophyllin sich dem Aptamer nähert, bilden zwei *internal-loop* Regionen eine hochstrukturierte Bindungstasche aus. Bei Anwesenheit strukturell ähnlicher Methylxanthinen (z.B. Coffein, Theobromin) wird keine entsprechende Struktur ausgebildet.

Der *induced-fit*-Mechanismus wurde auch für eine aus Anwendersicht besonders interessante Form von Aptameren nachgewiesen, für die *Aptamer-Beacons*. In Abbildung 1.4 ist eine solche Struktur gezeigt. Auch bei den *Aptamer-Beacons* handelt es sich um rein künstliche Konstrukte, deren Entwicklung durch vorangegangene Strukturberechnungen erleichtert wird. Bei dieser Art von Aptameren werden jeweils an den Enden des Oligonukleotidstrangs ein Fluorophor und ein passender „Fluoreszenzlöcher“ (Quencher) gebunden. Die Oligonukleotide sind so konstruiert, dass aufgrund der komplementären Sequenzen Farbstoff und Quencher räumlich nah beieinander liegen. Daraus resultierend liegt das Aptamer in einer *stem-loop*-Struktur vor.

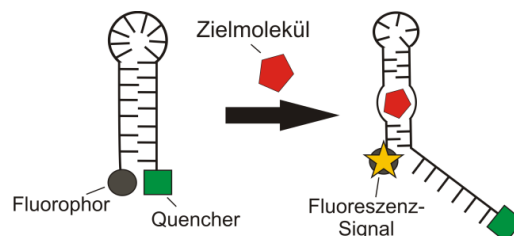


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines *Aptamer-Beacons*.

Die Bindung des Zielmoleküls induziert eine Konformationsänderung des Aptamers, woraufhin sich der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher vergrößert und dadurch eine

messbare Erhöhung der Fluoreszenzintensität entsteht [16, 49, 50]. Da das Fluoreszenzsignal proportional mit der Anzahl an gebundenen Zielmolekülen ansteigt, stellen Aptamer-*Beacons* eine vielversprechende Variante zur Detektion von unmarkierten Proteinen oder anderen Molekülen dar.

Basierend auf den klassischen *key-lock*- und *induced-fit*-Mechanismen sind auch weitere Bindungsformen zwischen Aptamer und Zielmolekül denkbar. Williams *et al.* (2000) berichten beispielsweise von RNA-Protein-Komplexen, welche sich durch einen beiderseitigen *induced-fit* bilden. Neben der Oligonukleotidstruktur können sich also auch Proteinstrukturen während der Bindung ändern, um einen stabilen Komplex zu formen [51]. Festzuhalten bleibt, dass der jeweilige Bindungsmechanismus von Aptamer zu Aptamer verschieden ist und daher für jeden Aptamer-Target-Komplex gesondert betrachtet werden muss.

Für die Charakterisierung und den Vergleich von Aptamer-Target-Komplexen ist die Bestimmung der Bindungsstärke unerlässlich. Da die Aptamer-Target-Bindung auf einem Gleichgewichtszustand analog zu Enzym-Substrat-Komplexen basiert, kann die Bindungsstärke über die Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden. Der K_D -Wert gibt dabei an, wo sich in einer Dissoziationsreaktion das Gleichgewicht einstellt. Je höher die Affinität des Aptamers zu seinem Zielmolekül ist, umso niedriger ist der K_D -Wert. Tabelle 1.1 zeigt eine Auswahl verschiedener publizierter DNA- und RNA-Aptamere mit ihren K_D -Werten. Die meisten Aptamere haben Dissoziationskonstanten im pico- bis nanomolaren Bereich. Vielfach weisen Aptamere ähnliche oder niedrigere K_D -Werte als die entsprechenden Antikörper-Target-Bindungen auf [52].

Tabelle 1.1 Übersicht verschiedener Aptamere und ihre Dissoziationskonstanten (K_D).

Aptamer	Target	K_D -Wert in nM	Referenz
DNA	Ethanolamin	0,006	[24]
RNA	P-Selectin	0,02	[53]
RNA	Thrombin	0,05	[54]
DNA	L-Selectin	1,8	[55]
DNA	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	1,4	[34]
RNA	Interferon- γ	2,7	[56]
DNA	Immunoglobulin E (IgE)	30	[57]

(Abbildung 1.5). Das Aptamer-Dimer zeigt eine deutlich erhöhte Affinität zu Thrombin als die beiden Monomere [64].

Die Dimerisierung von Aptameren könnte künftig vor allem im Bereich der Sensorik oder Aufreinigung von Vorteil sein. Denkbar ist auch die Immobilisierung eines Aptamer-Gemischs spezifisch gegen unterschiedliche Bindungsstellen des Zielmoleküls. Hierdurch wird das Zielmolekül an mehrere Aptamere gleichzeitig gebunden, wodurch die Bindungsstärke deutlich erhöht wird und somit zu niedrigeren Detektionsgrenzen eines aptamerbasierten Assays beitragen kann.

1.1.3 Selektion von Aptameren

Aptamere werden *in vitro* mithilfe eines als SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) bezeichneten Prozesses entwickelt. Diese Methode ist Anfang der 1990er Jahre von Tuerk und Gold [65] sowie Szostak [66] unabhängig voneinander entwickelt worden. Sie basiert auf der spezifischen Erkennung und Bindung von Oligonukleotiden an Zielstrukturen und ermöglicht so die Gewinnung der geeignetsten Aptamersequenzen gegen eine Vielzahl verschiedener Moleküle [67]. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte und die wichtigsten Varianten der SELEX vorgestellt.

1.1.3.1 Konventionelles SELEX-Verfahren

In Abbildung 1.6 sind die einzelnen Schritte des konventionellen SELEX-Verfahrens dargestellt. Das Zielmolekül wird auf einer festen Phase, meist einer Affinitätssäule bestehend aus Agarose oder Sepharose [66, 68], immobilisiert. Anschließend findet die Inkubation mit einer möglichst umfangreichen Oligonukleotidbibliothek (Pool), bestehend aus DNA- oder RNA-Sequenzen, statt.

Die initial verwendeten Oligonukleotidbibliotheken bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Sequenzen [69, 70], welche vollständig durch chemische Synthese hergestellt werden. Die große Vielfalt des DNA-Pools ist dadurch gewährleistet, dass jedes einzelne, synthetisierte Oligonukleotidmolekül eine einmalige Sequenz aufweist. In der Regel sind dies 40 Nukleotide lange *random*-Regionen, welche von zwei Primerbindungsstellen flankiert werden, wodurch sich bei vier verschiedenen Basen insgesamt 4^{40} ($= 1,2 \cdot 10^{24}$)

mögliche Sequenzabfolgen ergeben. In der Praxis ist jedoch die Komplexität im verwendeten Mikromolmaßstab auf 10^{14} bis 10^{15} individuelle Sequenzen limitiert [19, 71]. Die äußeren Nukleotidabschnitte stellen die zur Amplifikation der Oligonukleotide nötigen Primer-Bindungsstellen dar und haben eine Länge im Bereich von 20-25 Nukleotide (Abbildung 1.7).

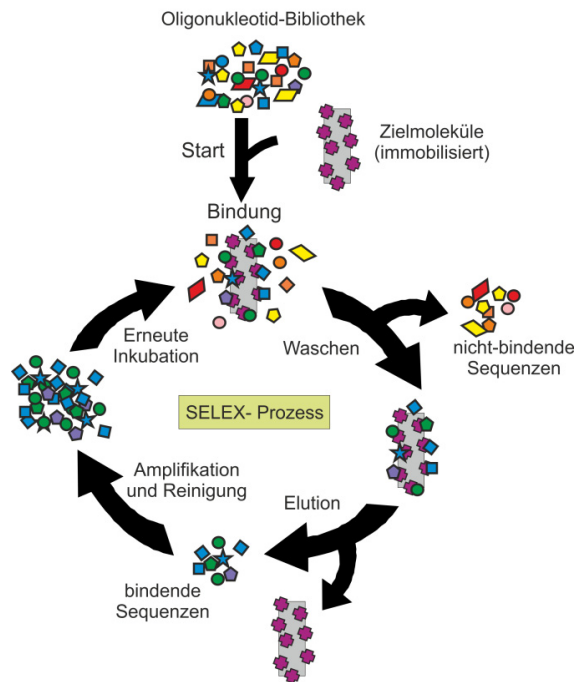


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von Aptameren.

Die Zusammensetzungen der Pools werden mit zunehmender Kenntnis über besonders geeignete Strukturelemente für die hochspezifische und sehr affine Bindung von Zielmolekülen, wie z.B. Quadruplexstrukturen, ständig verbessert.



Abbildung 1.7 Aufbau des verwendeten Oligonukleotidpools für den SELEX-Prozess.

Im weiteren SELEX-Verlauf werden die Sequenzen, welche keine oder nur eine geringe Affinität zum Zielmolekül aufweisen, durch verschiedene Waschschriffe von der Säule entfernt. Die stärker bindenden Sequenzen werden anschließend eluiert, mit PCR amplifiziert und bilden dann einen verkleinerten Pool für einen weiteren SELEX-Zyklus. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis nur noch eine kleine Auswahl an sehr stark bindenden Sequenzen im Oligonukleotid-Pool vorliegt. Normalerweise sind hierfür etwa zehn bis 15

Zyklen nötig [71]. Die erhaltenen Sequenzen werden im Anschluss an die SELEX amplifiziert und sequenziert. Im Nachhinein werden sie einzeln hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem Zielmolekül untersucht. Die Dauer des gesamten Prozesses inklusive abschließender Klonierungen mit Sequenzierungen dauert etwa zwei Monate [71]. Ist die Aptamersequenz einmal bekannt, kann das Aptamer relativ einfach und kostengünstig mit chemischer Festphasensynthese produziert werden.

Sind spezielle Eigenschaften der erhaltenen Sequenzen gewünscht, kann der SELEX-Prozess durch gezielte Variation angepasst werden. In einer so genannten Counter-SELEX können Aptamere mit stark erhöhter Spezifität gewonnen werden, welche auch zwischen sehr ähnlichen Strukturen, wie z.B. Enantiomeren, unterscheiden können [72, 73]. Hierfür wird nach der Elution der bindenden Sequenzen ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit einem strukturverwandten Molekül eingebaut. Jeong *et al.* (2010) gelang es mithilfe dieser Methode beispielsweise Aptamersequenzen zu generieren, welche spezifisch an aktives PSA (prostataspezifisches Antigen), aber nicht an inaktives proPSA, binden [74].

Um im Vorfeld die Sequenzen auszuschließen, welche unerwünschte Bindungen mit gewissen Strukturen eingehen, kann eine Negativ-SELEX vor der eigentlichen SELEX durchgeführt werden [73, 75-77].

1.1.3.2 MonoLEX

Die MonoLEX ist ein einstufiger Selektionsprozess zur Gewinnung von Aptamersequenzen. Der Prozess startet mit der Inkubation der Nukleinsäurebibliothek mit dem Targetmolekül, welches auf einer Affinitätssäule immobilisiert ist. Über eine anschließende Affinitätschromatographie werden die Oligonukleotide entsprechend ihrer Bindungsstärke zum Targetmolekül aufgetrennt. Die Sequenzen, welche weniger starke Wechselwirkungen mit dem Target eingehen, wandern schneller durch die Säule als solche mit starken Wechselwirkungen. Durch eine anschließende Aufteilung der Säule in einzelne Segmente können die hochaffinen Sequenzen separat eluiert, amplifiziert und analysiert werden [78]. Die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere gegen humanes F_c-Fragment stammen aus einem MonoLEX-Prozess der Firma AptaRes.

1.1.3.3 FluMag-SELEX

Die FluMag-SELEX unterscheidet sich von dem konventionellen Selektionsverfahren durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Quantifizierung der Nukleinsäuren [79, 80]. Bei diesem Verfahren werden die Targets an magnetische Partikel (*Magnetic Beads*) gekoppelt. Der große Vorteil in der Verwendung von *Magnetic Beads* liegt zum einen in der geringeren Menge an benötigtem Target und zum anderen in der automatisierbaren und schnellen magnetischen Separationstechnologie. Dies steigert die Effizienz des gesamten Prozesses. Durch die Fluoreszenzmarkierung der gebundenen Aptamere nach dem ersten Selektionszyklus kann die Abreicherung der nicht bindenden, sowie die Anreicherung targetspezifischer Aptamere während der SELEX kontrolliert werden. Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe können nach Abschluss des Selektionsprozesses für die weitere Analyse und Anwendungen von den Oligonukleotiden entfernt werden.

1.1.4 Anwendungen von Aptameren

Die Einsatzmöglichkeiten von Aptameren sind aufgrund ihrer vergleichsweise hohen Stabilität und einfachen Herstellung sehr vielfältig. Aktuell stellt die biologische und chemische Analytik den Haupteinsatzbereich dar, in welcher Aptamere in sogenannten „Aptasensoren“ Anwendung zur Detektion verschiedenster Substanzen, wie z.B. Biomoleküle oder Toxine finden [81, 82]. Ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Aptasensoren dient zur Detektion des Proteins Thrombin, da das Aptamer gegen Thrombin hinsichtlich der Struktur und des Bindungsmechanismus bestens charakterisiert ist.

Neuere Entwicklungen im Aptamersektor erweitern ihre Einsatzmöglichkeiten aber ständig. So werden Aptamere heute auch im medizinischen Bereich zur Diagnostik und Behandlung von Krankheiten oder bei der Entwicklung von Medikamenten eingesetzt [18, 83, 84]. Der große Vorteil von Aptameren liegt dabei in ihren geringen bzw. nicht immunogenen Eigenschaften. Ebenso kann die Pharmakokinetik von Aptameren durch gezielte chemische Modifikationen verbessert werden [18, 85]. Ein weiteres sehr interessantes Anwendungsgebiet stellt die Aufreinigung von Proteinen dar [86]. Bereits 1999 konnte ein rekombinantes Ig-Fusionsprotein über einen L-Selektin-Tag aus dem Überstand

eukaryotischer Zellkultivierungen mithilfe einer Aptamer-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden [87].

Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über besonders anschauliche Anwendungen von Aptameren in der Biosensorik, wobei auf eine spezielle Art von Aptasensoren, die aptamerbasierten Protein-Microarrays, in Kapitel 1.2 ausführlich eingegangen wird.

1.1.4.1 Aptasensoren

Biosensoren ermöglichen eine schnelle, günstige und benutzerfreundliche Detektion von Analyten in realen Proben, wie z.B. Glucose oder Lactat im Blut [88, 89] oder die Kontrolle von Bioprozessen. Bisher wurden neben Enzymen und Mikroorganismen hauptsächlich Antikörper als Biorezeptoren in der Biosensorik verwendet [90-92]. Aptamere sind eine vielversprechende Alternative zu Antikörpern, da sie viel robuster sind und gezielt modifiziert werden können, was eine Fluoreszenzmarkierung und eine gerichtete Immobilisierung auf festen Oberflächen ermöglicht [68]. Zudem ist durch eine leicht mögliche Regenerierung der Aptamere eine Wiederverwendbarkeit der Aptasensoren gewährleistet. Die Detektion bei Biosensoren auf Aptamerbasis erfolgt über optische, elektrische oder akustische Signale. Optische Sensoren basieren z.B. auf fluoreszenzmarkierten Zielmolekülen, welche von immobilisierten Aptameren spezifisch und hochaffin gebunden werden [93], was durch ein steigendes Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Lee und Walt veröffentlichten beispielsweise 2000 einen fluoreszenzbasierten Aptasensor zur Detektion von Thrombin [94].

In anderen Ansätzen werden Aptamere gezielt mit speziellen Nanopartikeln, welche als Fluorophore fungieren, funktionalisiert um anschließend eine visuelle Detektion des Zielmoleküls zu erreichen [95]. Diese Nanopartikel, auch Quantum Dots genannt, bestehen aus Metalloxiden, besitzen spezielle optische Eigenschaften und sind in verschiedenen Größen (1-100 nm) kommerziell erhältlich. Da die Streuintensität des Lichts stark von der Teilchengröße abhängt, ist eine anwendungsspezifische Auswahl der Nanopartikel möglich [96, 97]. Je größer der Partikel umso größer ist die Wellenlänge des Emissionsmaximums. Der große Vorteil an Nanopartikeln liegt in der sehr leicht durchzuführenden Modifizierung mit kovalenten Linkern, was eine gerichtete Bindung an das Aptamer ermöglicht, sowie in der hohen Quantenausbeute und Fluoreszenzintensität. Walter et al. (2010) gelang es, ein

Aptamer gegen prostataspezifisches Membranantigen (PSMA) an Goldnanopartikel zu binden und die Detektion von PSMA in menschlichem Prostatakrebsgewebe zu realisieren [98].

Auch Aptamer-*Beacons* werden als Basis von Aptasensoren eingesetzt. Die erste Entwicklung in diesem Bereich diente zur Detektion des Proteins Thrombin [49]. Andere Proteine als Target sind ebenfalls in der Literatur beschrieben [99, 100]. Tuleuova *et al.* (2010) konstruierten einen bimolekularen Aptamer-Beacon-Assay mit welchem das Protein Interferon-Gamma nachgewiesen werden konnte (Abbildung 1.8). Das targetbindende und immobilisierte Aptamer trägt ein Fluorophor und ist mit einem komplementären Oligonukleotidstrang hybridisiert, welcher den entsprechenden Quencher trägt. In Anwesenheit des Targets verändert sich durch die Targetbindung die Aptamerstruktur und die Bindung zum Oligonukleotidstrang des Quenchers geht verloren, wodurch das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt wird und gemessen werden kann [50].

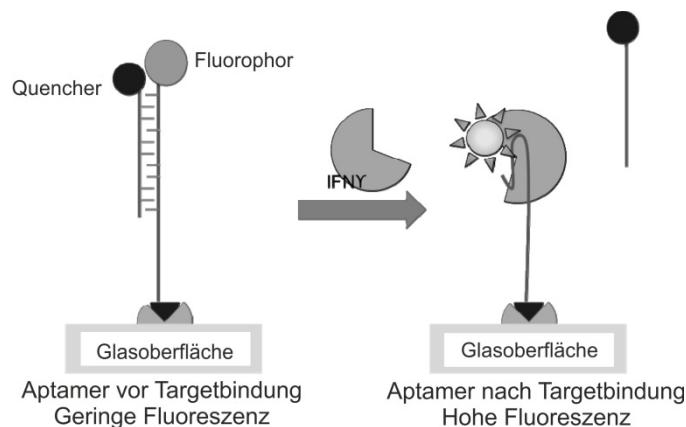


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung eines bimolekularen Aptamer-Beacons zur Detektion von Interferon-Gamma [50].

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR, *surface plasmon resonance spectroscopy*) stellt eine weitere Detektionsstrategie dar. Hierfür ist eine mit dünnem Goldfilm beschichtete Oberfläche nötig, welche mit polarisiertem und monochromatischem Licht bestrahlt wird. Hierbei kommt es zur Totalreflexion des Lichts an der Goldoberfläche. Durch eine Wechselwirkung des Lichts (Resonanz) mit den freien Elektronen der Goldoberfläche, welche das sogenannte Elektronenplasmon bilden, ist im Intensitätswinkelspektrum des totalreflektierten Lichts ein Minimum zu beobachten. Dieses Intensitätsminimum tritt in einem ganz bestimmten Winkel auf. Wird ein biotinyliertes Aptamer über Streptavidin an die Goldoberfläche gekoppelt so ändert sich nach Bindung des Analyten die Resonanzenergie der Plasmonen und die daraus resultierende Verschiebung des

Winkels kann gemessen werden. Tombelli *et al.* (2005) konnte so mit einem RNA-Aptamer das HIV-1 Tat-Protein detektieren [101]. Aber auch andere Proteine wie z.B. Thrombin und Immunoglobulin E (IgE) konnten mit SPR bereits nachgewiesen werden [102, 103].

Die elektrochemische Detektion mit Aptasensoren erfolgt über die Messung eines elektronischen Flusses und hat gegenüber den anderen beiden Strategien den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität, geringeren Herstellungskosten und guten Miniaturisierbarkeit [104]. Ikeburo *et al.* (2010) konnten in einem Sandwich-Format das Protein Thrombin mithilfe elektrochemischer Detektion nachweisen. In einem Sandwich-Format bindet der Analyt an das immobilisierte Fängermolekül. Die Detektion findet anschließend über ein geeignetes Detektionsmolekül statt. Im Falle von Aptameren kann von einem sogenannten „*Captamer*“ und „*Detectamer*“ gesprochen werden [105]. Das „*Captamer*“ wurde bei Ikeburo *et al.* (2010) auf einer Gold-Oberfläche immobilisiert und anschließend konnte über eine Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH), welche an das „*Detectamer*“ gekoppelt war, nach Zugabe von Glucose erfolgreich Thrombin nachgewiesen werden [106]. Die Glucose wird nur in Anwesenheit der Dehydrogenase oxidiert, wodurch ein Elektronenfluss vom „*Detectamer*“ zur Goldoberfläche hervorgerufen wird. Dieser elektrochemische Fluss kann an der Oberfläche gemessen werden und ist proportional zu der Menge an vorhandenem Analyt.

Ein Sensor aus der Kategorie der akustischen Sensoren basiert auf der Verwendung von piezoelektrischen Oberflächen, wie z.B. Quarzkristallen. Quarz hat piezoelektrische Eigenschaften und ermöglicht damit eine massenabhängige Detektion der Aptamer-Target-Bindung. Bei mechanischer Einwirkung ändert sich die Eigenschwingung des Quarzes. Wird das Aptamer auf einem Quarzkristall immobilisiert, so bewirkt die Massenänderung während der Targetbindung ein Absinken der Resonanzenergie des piezoelektrischen Materials [107, 108]. Diese Änderung der Resonanzenergie kann gemessen werden und ist proportional zu der Menge an gebundenen Targetmolekülen.

Die Beispiele in diesem Abschnitt zeigen anschaulich das große Potential von Aptameren als Fängermoleküle in Biosensoren, das bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Die Detektionsgrenzen der bisher veröffentlichten Aptasensoren liegen im pico- bis nanomolaren Bereich, was in etwa im gleichen Bereich von Sensoren liegt bei welchen Antikörper als

Fängermoleküle fungieren [92, 109]. Vor allem das breite Spektrum unterschiedlichster Sensorformate in welchen Aptameren eingesetzt werden können, steigert die Attraktivität ihres Einsatzes als Biorezeptoren maßgeblich. Ebenso macht die Regenerierbarkeit der Aptasensoren und die daraus resultierenden Kostenersparnisse Aptamere attraktiv für die Überwachung industrieller Prozesse. Bis Aptasensoren routiniert in der Prozesskontrolle eingesetzt werden können, sind jedoch noch weitere grundlegende Untersuchungen nötig. Vor allem die Detektion mehrerer, verschiedener Analyten in einer Probe (*Multiplexing*) ist bisher nur schwer umsetzbar. Die bisher publizierten Aptamere wurden unter den unterschiedlichsten Selektionsbedingungen gewonnen, was eine parallele Funktionalität verschiedener Aptamere in einem Sensor erschwert. Diese Problematik könnte in Zukunft durch Verwendung gleicher Selektionsbedingungen bei der Gewinnung verschiedener Aptamere zunehmend umgangen werden.

1.2 Protein-Microarrays

Microarrays, oft DNA- oder Proteinchips genannt, sind analytische Systeme zur Detektion einer Vielzahl an Analyten (bei DNA-Microarrays z.B. mehr als 10.000 Gensequenzen) auf kleinstem Raum. Ein Microarray besteht aus einer festen Oberfläche, meist einem Glasträger, auf welchem diverse Fängermoleküle immobilisiert werden können. Die Fängermoleküle binden mit hoher Spezifität die entsprechenden, farbstoffmarkierten Analyten aus der Probe. Der Bindungserfolg wird in der Regel mithilfe eines speziellen laserbasierten Fluoreszenzscanners nachgewiesen.

Das Immobilisieren der Fängermoleküle auf den Microarrays wird mit automatischen Robotern durchgeführt. Die Roboter können minimale Mengen (im Pikoliterbereich) verschiedener Lösungen in Form von kleinen Punkten („Spots“) in geringen Abständen auf die Oberfläche aufbringen. Dieser Vorgang wird auch „Spotting“ genannt. Prinzipiell werden zwei Arten von Microarrays unterschieden, die DNA-Microarrays und Protein-Microarrays. DNA-Microarrays bestehen aus immobilisierten DNA-Fragmenten welche mit den entsprechenden komplementären und markierten Nukleotidsträngen in der Probe hybridisieren. Zur Detektion werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Nach der rasanten und geradezu revolutionären Entwicklung dieser Microarrays zur Untersuchung von Genexpressionsprofilen ab den späten 1990er Jahren wurde die Microarray-Technologie auch

auf andere Biomoleküle ausgeweitet. Aufgrund einer Vielzahl technischer Weiterentwicklungen, wie Miniaturisierung und Automatisierungen, konnten neben den Oligonukleotiden und PCR-Produkten auch das Spotten von weiteren Molekülen, wie z.B. Proteinen, Peptiden, Kohlenhydraten und sogar lebenden Zellen auf verschiedenen Trägermaterialien realisiert werden [110].

Protein-Microarrays sind Bioassays, mit welchen Proteine hoch parallelisiert detektiert werden können. Während DNA-Microarrays Informationen auf Transkriptomebene, also über die Gesamtheit aller transkribierten RNA-Moleküle, liefern, können mit Protein-Microarrays bereits von der Zelle translatierte, vorhandene Proteine detektiert werden. Parallelisierbare Protein-Microarrays stellen eine hervorragende Adaption der DNA-Microarray-Technologie zur Proteomanalyse dar.

Seit dem Aufkommen der Proteinchip-Technologie mit der Jahrtausendwende dienen Antikörper oder Antikörperfragmente als Fänger- und Detektionsmoleküle auf konventionellen Protein-Microarrays [111, 112]. Aufgrund der komplexen Eigenschaften von Proteinen ist die Entwicklung und Anwendung solcher Assays weitaus schwieriger als bei Nucleinsäuren. Vor allem die Immobilisierung stellt eine Herausforderung dar. Oft ist es nicht möglich, Proteine ohne Verlust ihrer nativen Konformation an planare Oberflächen zu koppeln [110]. Hierfür sind spezielle dreidimensionale Oberflächen, wie Nitrocellulose [4, 113] oder Hydrogele [7] nötig. Ebenso können nach Immobilisierung der Proteine die Bindungsstellen (Epitope) verdeckt sein, wodurch eine nachfolgende Detektion erschwert wird. Aus diesen Gründen spielt die Untersuchung und Charakterisierung verschiedener Oberflächen eine entscheidende Rolle in der Protein-Microarray-Technologie.

Ein wesentlicher Nachteil der Protein-Microarrays ist die geringe Haltbarkeit von nur wenigen Wochen. Generell stellt schon die Bereitstellung von entsprechenden Mengen an Proteinen in erforderlicher Reinheit ein weiteres Hindernis während der Entwicklung von Protein-Microarrays dar. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein revolutionärer Durchbruch der Protein-Microarray-Technologie bisher ausblieb.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von Aptameren anstatt der herkömmlich verwendeten Antikörpern. Antikörper können nicht ohne weiteres gegen jedes beliebige Target gewonnen werden, zudem werden sie nur unter physiologischen Bedingungen

entwickelt. Werden Antikörper modifiziert, beispielsweise mit Farbstoffen, so kann dies die Aktivität maßgeblich beeinflussen. Aptamere lassen sich wesentlich einfacher an diverse Farbstoffmoleküle oder funktionelle Gruppen zur Kopplung an die Chip-Oberflächen binden. Sie können im Gegensatz zu Antikörpern nicht nur gegen Proteine sondern auch gegen viele andere Moleküle selektiert werden, was die Entwicklung von ganz neuartigen weiteren Assays, z.B. zur Detektion von Toxinen oder organischen Molekülen, auf festen Phasen ermöglicht.

Im Folgenden werden die herkömmlichen Microarray-Formate sowie verschiedene mögliche Oberflächenmodifizierungen und Immobilisierungsstrategien in der Microarray-Technologie vorgestellt. Im Anschluss daran wird näher auf die Herstellung und Anwendung aptamerbasierter Microarrays eingegangen.

1.2.1 Microarray- Formate

Protein-Microarrays können in drei Formate eingeteilt werden: *Forward-Phase*, *Reverse-Phase* und Sandwich-Format (Abbildung 1.9).

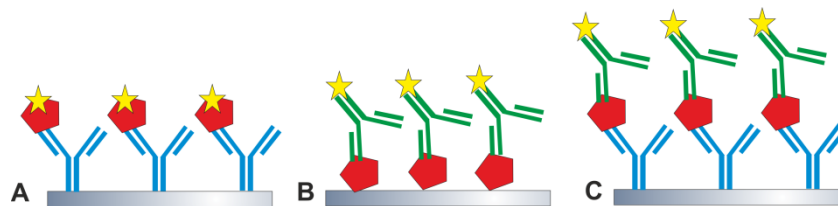


Abbildung 1.9 Schematische Darstellung möglicher antikörperbasierter Microarray-Formate: (A) *Forward-Phase*-, (B) *Reverse-Phase*- und (C) Sandwich-Format.

Im *Forward-Phase*-Format werden Fängermoleküle auf der Oberfläche immobilisiert und die Probe mit den zu detektierenden Analyten wird anschließend mit dem Chip inkubiert (Abbildung 1.9 A). Die gesamte Probe wird dafür im Vorhinein fluoreszenzmarkiert, aber nur die gebundenen Analyten werden gemessen. Diese nötige Modifizierung der Probe stellt hier den großen Nachteil dar, da dies eine größere Menge an Probenmaterial voraussetzt und eine gleichmäßige Markierung einer komplexen Probe nicht gewährleistet werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit, dass der Farbstoff an die Epitope des Proteins bindet und somit die Bindung an die immobilisierten Antikörper be- oder sogar verhindert [112, 114, 115]. Die Markierung der Proben erfolgt in der Regel über eine kovalente Bindung an Aminogruppen

des Proteins über N-Hydroxysuccinimid oder Isothiocyanat, welche an das Fluorophor gekoppelt sind.

Eine Alternative bietet hier die Verwendung von markierungsfreien Detektionssystemen, wie z.B. die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) (siehe Abschnitt 1.3.1) oder Rasterkraftmikroskopie [114, 116]. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie können Variationen des Potentials einer Oberfläche und somit Aussagen über das Maß an gebundenen Analyten auf dem Microarray gewonnen werden. Der große Vorteil der *Forward-Phase-Assays* besteht in der Möglichkeit, verschiedene Fängermoleküle gleichzeitig auf einer Oberfläche zu immobilisieren, was eine simultane Detektion verschiedener Analyten in einer Probe ermöglicht.

Wird anstatt des Fängermoleküls die zu untersuchende Probe direkt auf der Microarray-Oberfläche immobilisiert, handelt es sich um ein *Reverse-Phase-Format* (Abbildung 1.9 B). Hier findet die Detektion über ein fluoreszenzmarkiertes Detektionsmolekül statt. Dieser Assay ermöglicht die parallele Untersuchung eines Zielproteins in einer Vielzahl von Proben auf einem Microarray unter identischen Bedingungen. Während der Immobilisierung konkurrieren die zu untersuchenden Proteine mit allen anderen Proteinen in der Probenlösung, was eine ausreichende Bindung und eine nachfolgende Detektion erschwert [115, 117, 118]. Der Nachteil bei der Verwendung von komplexeren Proben besteht in dem relativ geringen Anteil an zu untersuchendem Analyt mit einer daraus resultierenden schlechten Signalintensität.

Im Sandwich-Format wird sowohl ein Fängermolekül als auch ein Detektionsmolekül eingesetzt (Abbildung 1.9 C). Trotz des höheren Arbeitsaufwands, sowohl in der Entwicklungsphase, als auch in der praktischen Anwendung wegen des zusätzlichen Inkubationsschritts birgt dieses Format viele Vorteile. Es ist keine Markierung der Proben nötig und durch den Einsatz von zwei Fängermolekülen kann die Sensitivität und Selektivität des Assays erheblich gesteigert werden. Bei Verwendung von Antikörper-basierten Microarrays konnten Jaras *et al.* (2007) zeigen, dass ein Sandwich-Assay zur Detektion von prostataspezifischem Antigen (PSA) ein 10^5 -fach höheres Detektionslimit aufweist, als der entsprechende Microarray im *Reverse-Phase-Format* [13]. Bei der Wahl geeigneter Fängermoleküle sollte darauf geachtet werden, dass diese an verschiedene Epitope des

Target-Proteins binden, um eine Bindung möglichst an gegenüberliegenden Seiten zu gewährleisten [112, 115].

1.2.2 Oberflächen und Immobilisierungsstrategien

Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung von Microarrays ist die Immobilisierung der Fängermoleküle oder Proben auf Oberflächen. Das am häufigsten verwendete Substrat in der DNA-Microarray-Technologie ist eine modifizierte Glasoberfläche. Bei Glas handelt es sich um eine homogene Oberfläche, so dass für jeden Spot eine gleiche Immobilisierungseffizienz gewährleistet ist. Desweiteren ist es ein vergleichsweise günstiges Material und hält hohen Anforderungen wie extremen Temperaturen und pH-Werten stand. Ebenso ist Glas nicht porös und weist ein relatives geringes Hintergrundsignal auf [119]. Durch chemische Modifizierungen der Glasoberflächen ist es möglich, nahezu jede beliebige chemische Gruppe auf der Oberfläche einzuführen, welche eine kovalente Immobilisierung der Fängermoleküle ermöglicht. Neben der kovalenten Bindung ist es auch möglich Moleküle über Physisorption, also über physikalische Kräfte, wie Van-der-Waals-Wechselwirkungen, an die Oberfläche zu binden. Diese Bindungen sind jedoch schwächer als kovalente Bindungen und es besteht die Gefahr, dass das Molekül wieder von der Oberfläche abgewaschen wird.

Mit dem Aufkommen der Protein-Microarrays war es notwendig, geeignete Oberflächen zur Immobilisierung von Antikörpern zu entwickeln. Im Gegensatz zu Oligonukleotiden sind Antikörper weniger stabil und sollen auch noch nach der Immobilisierung in ihrer nativen Konformation vorliegen [120]. Trotz der vielfachen Vorteile von Glassubstraten, eignen sich diese Oberflächen nur mäßig für Proteinimmobilisierung. Bessere Ergebnisse hinsichtlich der Bindungskapazität und Stabilität und somit Funktionalität der gebundenen Proteine liefern nicht-planare, dreidimensionale Oberflächen, wie Gele bestehend aus Agarose, Hydrogel oder Acrylamid, sowie Nitrocellulosemembranen.

Da die Anforderungen an eine Oberfläche je nach zu immobilisierendem Fängermolekül unterschiedlich sind, wird in den folgenden Abschnitten die Immobilisierung von Oligonukleotiden und Proteinen getrennt betrachtet.

1.2.2.2 Substrate zur Immobilisierung von Oligonukleotiden

Da Oligonukleotide und Glasoberflächen leicht modifiziert, also mit einem speziellen molekularen Linkern versehen werden können, wurden eine Vielzahl verschiedener Immobilisierungsstrategien entwickelt. Eine Übersicht möglicher Immobilisierungsstrategien ist in Abbildung 1.10 gezeigt. Im Bereich der Nukleinsäure-Microarray-Technologie findet die Kopplung der Oligonukleotide an Oberflächen meist über die Bindung von Aminolinkern an aldehyd- oder epoxy-modifizierte Glasoberflächen statt [121] (Abbildung 1.10 A). In anderen Ansätzen werden aminomodifizierte Oberflächen mit bifunktionalen Linkern, wie Dialdehyd oder Phenylendiisocyanat (PDIC) versehen, was anschließend eine Immobilisierung aminomodifizierter Oligonukleotide ermöglicht (Abbildung 1.10 B). Bei Verwendung von thiolierten Oligonukleotiden kann die Kopplung über symmetrische Diisothiocyanate an aminomodifizierte Oberflächen erfolgen [119, 122] (Abbildung 1.10 C).

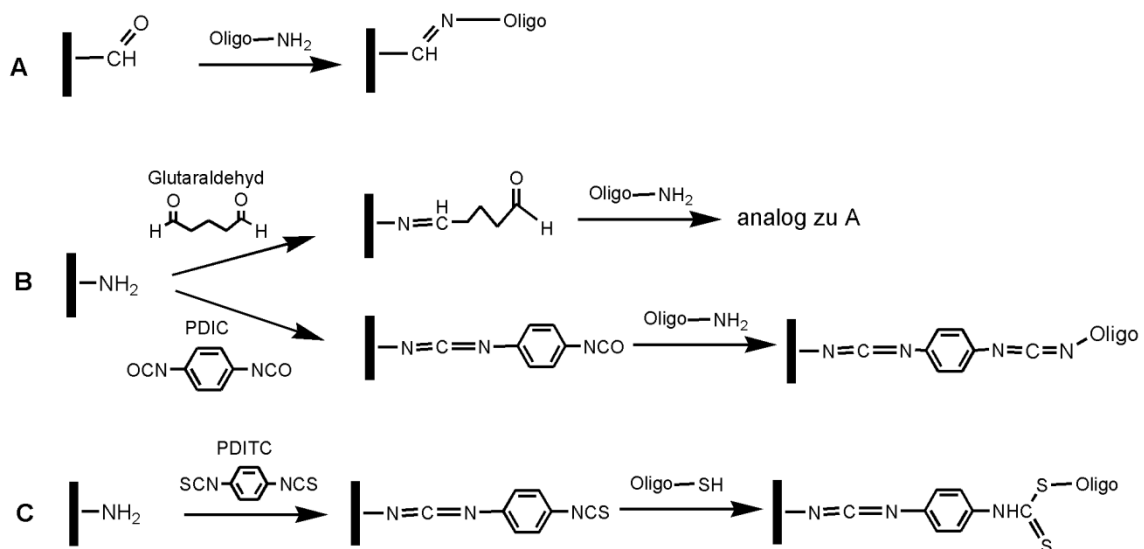


Abbildung 1.10 Schematische Darstellung chemischer Reaktionen zur Kopplung von Oligonukleotiden an verschiedene Oberflächen. (A) Kopplung von Oligonukleotiden mit Aminolinkern an aldehydmodifizierte Oberflächen, (B) Aktivierung von Amino-oberflächen mit Glutaraldehyd bzw. PDIC zur Kopplung von aminomodifizierten Oligonukleotiden, (C) Aktivierung mit Phenylendiisothiocyanat (PDITC) zur Bindung von thiolierten Oligonukleotiden.

1.2.2.1 Substrate zur Immobilisierung von Proteinen

Neben planaren, zweidimensionalen Oberflächen, werden zur Immobilisierung von Proteinen vermehrt dreidimensionale Substrate, wie spezielle Gele oder Nitrocellulose eingesetzt. Diese

Substrate weisen aufgrund ihrer dreidimensionalen Matrix eine höhere Bindungskapazität pro Spot auf als beispielsweise Glasoberflächen [123, 124]. Da die Bindung der Proteine über Adsorption erfolgt liegt hier eine ungerichtete Immobilisierung vor, das heißt die Proteine werden in zufälliger Orientierung gebunden. Ein großer Vorteil dreidimensionaler Substrate ist daher, dass die Proteine während der Immobilisierung nicht in ihrer Konformation verändert werden.

Bei den Gelmatrizes handelt es sich um Polymere, beispielweise Acrylamid oder Agarose, welche durch Verknüpfungen einzelner Moleküle über kovalente sowie ionische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte ein dreidimensionales Netzwerk aufbauen. Zhou *et al.* (2004) immobilisierten Proteine auf einem Hydrogel und zeigten die potentielle Anwendbarkeit in der Protein-Microarray-Technologie [7]. Ein Nachteil ist hier jedoch die geringe Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine in das Gel was zu einer geringen Reproduzierbarkeit der Experimente führt und die Detektion geringer Proteinkonzentrationen erschwert [120].

Eine vielversprechende Alternative ist die Verwendung von Nitrocellulose zur Immobilisierung von Proteinen [4, 125]. Bei Nitrocellulose handelt es sich um ein mikroporöses Cellulose-Polymer, aufgebaut aus nitrierten β -D-Glucoseseinheiten. Die Immobilisierung der Proteine erfolgt wie bei den Gelen über Adsorption, also elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen [126].

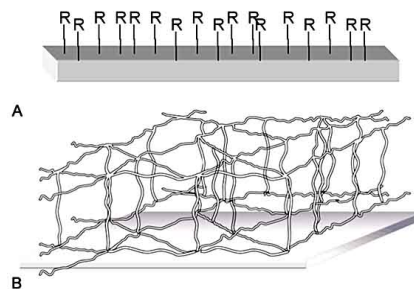


Abbildung 1.11 Schematische Darstellung des Aufbaus von (A) zweidimensionalen, planaren und (B) dreidimensionalen mikroporösen Microarray-Substraten [126].

Zur Microarray-Herstellung wird die Nitrocellulose in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und anschließend als dünne Schicht auf Glasobjektträger aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels entsteht ein dünner Film Nitrocellulose.

Ein Nachteil in der Verwendung von Nitrocellulosesubstraten besteht in dem relativ hohen Hintergrundsignal bei Verwendung von Fluoreszenzscannern zur Detektion, was zu einer verminderten Spotqualität führt. Dieses Hintergrundsignal basiert auf der hohen Eigenfluoreszenz der Nitrocellulose. Durch Auftragen von möglichst dünnen Schichten an Nitrocellulose auf den Microarrays kann jedoch eine Verringerung des Hintergrundsignals erzielt werden [125].

1.2.3 Aptamerbasierte Microarrays

Microarrays sind eines der wichtigen Sensorsysteme für parallele *High-Throughput-Screenings*. Aptamer-Microarrays vereinen dabei sowohl die Vorteile von DNA- als auch antikörperbasierten Protein-Microarrays.

Die DNA-Microarray-Technologie liefert bezüglich der beschriebenen möglichen Immobilisierungsstrategien von Oligonukleotiden auf festen Oberflächen wertvolle Informationen und Erfahrungen. Da jedoch die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des Aptamers für die Target-Bindung unabdingbar ist, stellt die Immobilisierung der Aptamere auf Microarray-Oberflächen eine weitaus größere Hürde dar, als im Falle von DNA-Microarrays. Die Bindung des Aptamers an die Oberfläche kann kovalent erfolgen, beispielsweise über die Bindung eines Aminolinkers an aldehyd- oder epoxy-modifizierte Oberflächen, oder über nicht kovalente Biotin-Avidin-Wechselwirkungen. In beiden Fällen muss auch nach Bindung des Aptamers die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur noch gewährleistet sein, um eine Bindung des Targetproteins zu ermöglichen. Probleme bezüglich der Bindungseigenschaften zum Target können sowohl durch sterische, wie auch elektrostatische Wechselwirkungen des Aptamers mit der Microarray-Oberfläche hervorgerufen werden [9, 19].

Es wurden bisher unterschiedliche Ansätze entwickelt, eine inkorrekte Faltung der immobilisierten Aptamere zu umgehen. Eine bereits bei antikörperbasierten Protein-Microarrays eingesetzte Möglichkeit basiert auf einer gerichteten Immobilisierung über die Bindungen zwischen Biotin und Avidin bzw. Biotin und Streptavidin [11, 12]. Ein Nachteil besteht hier in der relativ geringen Stabilität von Avidin und Streptavidin. Eine andere Möglichkeit ist, analog zu den DNA-Microarrays, die Immobilisierung der Aptamere über

einen Aminolinker auf aldehydmodifizierten Glaträgern. Mit dieser Methode konnten Stadtherr *et al.* (2005) IgE mit Aptamer-Microarrays nachweisen [127].

Die zusätzliche Einführung eines molekularen Spacers zwischen Aptamer und Oberfläche hat einen positiven Effekt auf die Aptamerfaltung und somit auf die Bindung des Zielmoleküls [9, 10] (Abbildung 1.12). Dies kann einerseits durch das Einführen zusätzlicher Sequenzen an eines der Aptamerenden oder durch die Modifizierung der Oberfläche mit geeigneten Spacermolekülen realisiert werden. Walter *et al.* (2008) bestätigten die Notwendigkeit einer vorangehenden Oberflächenmodifizierung mit geeigneten Spacern für eine korrekte Aptamerfaltung [9]. In einer anderen Arbeit zeigten Lao *et al.* (2009), dass die Sensitivität des Aptamer-Assays durch das Anhängen von Oligo(dT)-Spacern an das Aptamer maßgeblich erhöht werden kann [10].

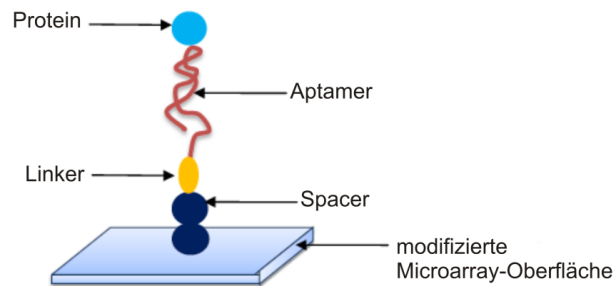


Abbildung 1.12 Schematische Darstellung eines Aptamer-Microarrays im *Forward-Phase*-Format mit molekularem Spacer zwischen Oberfläche und Aptamer.

Im Bereich der parallelen Detektion verschiedener Targets auf einem Microarray, auch Multiplexing genannt, sind Aptamer-Microarrays noch deutlich limitiert. Die meisten Aptamere werden unter unterschiedlichen Bedingungen hinsichtlich der Pufferzusammensetzung, des pH-Werts und der Temperatur selektiert. Somit ist es schwierig einen Assay zur Detektion verschiedener Proteine in einer Probe zu entwickeln, da jedes Aptamer seine optimale Faltung unter anderen Bedingungen ausbildet. In einer ersten Arbeit in dieser Richtung ist es Cho *et al.* (2006) gelungen, vier verschiedene Proteine auf einem Aptamerchip zu detektieren [12]. Dazu wurden vier verschiedene Aptamere auf einem Microarray immobilisiert. Die Problematik der unterschiedlichen Selektionsbedingungen wurde mit der Entwicklung eines geeigneten „Universalpuffer“ gelöst, in welchem alle verwendeten Aptamere eine ausreichende Funktionalität aufweisen. Ein vielversprechenderer Ansatz wäre die gezielte Entwicklung verschiedener Aptamere unter den gleichen Bedingungen.

Tabelle 1.2 zeigt eine Übersicht der bisher publizierten klassischen Aptamer-Microarrays, welche auf planaren Glasoberflächen mit definierten Spots basieren. Bis auf den aptamerbasierten Microarray von Roh *et al.* (2010), welcher auf dem *Reverse-Phase-Format* basiert, handelt es sich um *Forward-Phase-Assays*. Im Vergleich zu der großen Vielfalt an Aptasensoren ist die Anzahl der publizierten aptamerbasierten Microarrays momentan gering. Dies liegt vor allem an der noch nicht ausgereiften Parallelisierbarkeit dieser Microarrays. Soll ein geeignetes System zur Detektion eines speziellen Proteins entwickelt werden, so ist es zur Zeit attraktiver auf andere Aptasensoren, welche auf Einzelmessungen basieren, zurückzugreifen.

Tabelle 1.2 Übersicht über bisher publizierte Aptamer-Microarrays.

Target	Aptamer	Immobilisierung	LOD	Jahr	Literatur
Hepatitis C Virus (HCV)	RNA	Hydrostatische Wechselwirkungen	5 ng/mL	2010	Roh <i>et al.</i> [128]
Thrombin	DNA	Epoxy/NH ₂	2 ng/mL (50,6 pM)	2009	Lao <i>et al.</i> [10]
His-Tag, Streptavidin	DNA	Aldehyd/NH ₂	-	2008	Walter <i>et al.</i> [9]
Lysozym, Ricin, Thrombin, IgE	RNA/DNA (Multiplex)	Streptavidin/Biotin	Lysozym: 5 pM Ricin: 0,5 nM IgE: 0,01 nM Thrombin: 5 nM	2006	Cho <i>et al.</i> [12]
Thrombin, IgE (duale Detektion)	DNA	Aldehyd/NH ₂	10 ng/mL IgE (0,06 nM)	2005	Stadtherr <i>et al.</i> [127]
HIV-1 Tat	RNA	Aldehyd/NH ₂	-	2005	Yamamoto <i>et al.</i> [129]
Lysozym	RNA	Streptavidin/Biotin	1 pg/mL (70 fM)	2004	Collet <i>et al.</i> [130]
Interleukin, VEGF, Endostatin	DNA (Photoaptamer)	NHS/NH ₂	10 fM	2004	Bock <i>et al.</i> [131]

Dennoch stellen Aptamer-Microarrays ein vielversprechendes analytisches System dar, vor allem als schnelles und effektives Screening-Tool. Verschiedene Aptamersequenzen können hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten und -spezifitäten an Moleküle untersucht werden. Dies ist beispielsweise nach einer SELEX hilfreich, um aus einem Pool von mehreren bindenden Aptamersequenzen, das geeignetste Aptamer zu bestimmen. Bei der Entwicklung anderer aptamerbasierter Systeme, wie neuartiger Aufreinigungssäulen, können Aptamer-Microarrays ebenso als hilfreiches Tool für die Optimierung der Aptamerimmobilisierung eingesetzt werden. Auf der Microarray-Oberfläche können verschiedene Aptamer-Immobilisierungsstrategien unter Verwendung relativ geringer Mengen an Probenmaterial unter den verschiedensten Bedingungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Pufferzusammensetzung getestet werden. Die erhaltenen Informationen können anschließend auf einen Prozess zur Aufreinigung übertragen werden [132]. Bezüglich der Anwendung von Aptamer-Microarrays als Screening-Tool gibt es bereits einige publizierte Arbeiten. Fischer *et al.* (2011) verwendeten beispielsweise Aptamer-Microarrays zur Identifizierung minimaler funktioneller Aptamersequenzen [133]. In einer anderen Veröffentlichung wurden verschiedene Aptamersequenzen gegen Thrombin auf Microarrays immobilisiert und ihre Bindungseigenschaften miteinander verglichen [134].

Um zukünftig das große Potential der Aptamer-Microarrays komplett ausschöpfen zu können, müssen zunächst weitere Grundlagen geschaffen werden. Untersuchungen hinsichtlich der Bindungseigenschaften zwischen Aptamer und Target oder auch die Anwendung neuartiger Immobilisierungs- und Detektionsstrategien für verschiedenste Analysensysteme stehen im Mittelpunkt der aktuellen aptamerbasierten Forschung. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stellen somit einen Wegweiser für zukünftige innovative Entwicklungen in der Aptamer-Microarray-Technologie und somit für die Biosensorik dar.

2 Ergebnisse und Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung aptamerbasierter Microarrays zur Detektion von Proteinen. Dies soll auf drei verschiedenen Wegen realisiert werden: im *Forward-Phase*-, *Reverse-Phase*- sowie im Sandwich-Format. Der Schwerpunkt liegt dabei einerseits in der Entwicklung neuer Immobilisierungsstrategien von Aptameren auf Microarrayoberflächen, aber auch in der näheren Charakterisierung der entwickelten Formate hinsichtlich des Detektionslimits und der Spezifität, sowie der Anwendbarkeit zur Analyse von komplexen Proben.

Ausgehend von zwei Aptameren gegen den Histidin-Tag, welche als Modellsystem dienten, wurden die Detektionsstrategien für den *Forward*- und den *Reverse-Phase*-Assay entwickelt und anschließend auf die Aptamere gegen humanes F_c-Fragment und VEGF₁₆₅ übertragen. Schließlich wurde auf Basis der Ergebnisse ein aptamerbasierter Sandwich-Assay zur Detektion von humanem F_c-Fragment entwickelt. Das VEGF wurde in *E. coli* nach erfolgreicher Klonierung des entsprechenden Gens in einen geeigneten Expressionsvektor produziert und aufgereinigt.

In diesem Kapitel werden zunächst die verwendeten Aptamere und ihre Targetproteine vorgestellt sowie auf die Methoden zur Herstellung und Auswertung der Microarrays eingegangen. Im darauf folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Microarray-Analysen dargestellt und diskutiert. Detaillierte Beschreibungen der verwendeten Methoden und Materialien sind im Anhang dieser Arbeit (ab Seite 123) zu finden.

2.1 Verwendete Aptamere

Ein Großteil der Studien wurde mit Aptameren gegen den Histidin-Tag durchgeführt. Die auf Basis dieser Aptamere entwickelten Detektionsmethoden wurden im Anschluss auf weitere Aptamere übertragen. Zum einen sind das Aptamere gegen humanes F_c-Fragment, zum anderen auch Aptamere gegen den humanen Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ (*vascular endothelial growth factor*).

Die Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere und ihre Nukleotidsequenzen. Dabei handelt es sich ausschließlich um DNA-Aptamere, welche zwischen 25 und 63 Nukleotide lang sind. Die Oligonukleotide wurden bei der Firma Biospring (Frankfurt a. Main) mit unterschiedlichen Modifikationen synthetisiert. Zur Immobilisierung der Aptamere im *Forward-Phase*-Format wurden sie am 3'- bzw. 5'-Ende mit einem C₆-Amino-Linker versehen. Im Falle eines *Reverse-Phase*-Assays wurden Aptamere verwendet, welche eine Cy3-Markierung an ihrem 3'- bzw. 5'-Ende aufweisen.

Tabelle 2.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Aptamere. Identische Sequenzabfolgen sind blau markiert.

Aptamer	Größe	Target	Sequenz (5' → 3')	K _D -Wert	Quelle
6H7	40 mer	His-Tag	GCTATGGG TGGTCTGGTTGGG ATTGG CCCCGGGAGCTGGC	0,4 - 42 nM	[135]
6H5	40 mer	His-Tag	GGCTTCAGG TGGTCTGGTTGGG TTTG GCTCCTGTGTACG	30 - 176 nM	[135]
264	63 mer	hum F _c	TACGACTCACTATAGGGATCCTTGCTT ACATTACGACGTA CTGAATTCCCTTTA GTGAGGGTT	n. b.	AptaRes ⁴
265	63 mer	hum F _c	TACGACTCACTATAGGGATCCATAGA AAACCCCTAAACGCC GAATTCCCTT TAGTGAGGGTT	n. b.	AptaRes
266	63 mer	hum F _c	TACGACTCACTATAGGGATCCTACGT CATTATGGAAACCGAC GAATTCCCTT TAGTGAGGGTT	n. b.	AptaRes
V7t1	25 mer	VEGF ₁₆₅ ⁵	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA	1,4 nM	[34]
del5_1	50 mer	VEGF ₁₆₅ ⁶	ATACCAGTCTATTCAATTGGGCCCGT CCGATGGTGGGTGTGCTGGCCAG	476,2 nM	[64]

Um im Vorfeld der Studien eine Vorstellung von der räumlichen Struktur und thermodynamischen Stabilität der gefalteten Aptamere zu bekommen, wurden anhand der Nukleotidsequenzen für alle Aptamere die möglichen Sekundärstrukturen mithilfe des Programms Mfold⁷ theoretisch berechnet.

⁴ <http://www.aptares.net/>

⁵ gegen RBD: *receptor-binding domain*

⁶ gegen HBD: *heparin-binding domain*

⁷ <http://mfold.rna.albany.edu/>

2.1.1 Aptamere gegen Histidine-Tag

Die Aptamere 6H7 und 6H5, gerichtet gegen den Histidin-Tag, sind publizierte Sequenzen, die der Patentschrift US 7329742 [135] entnommen wurden. Bei dem in der SELEX verwendeten Puffer handelt es sich um einen Phosphatpuffer (50 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5), welcher im Folgenden als PBST-6H7 abgekürzt wird.

Die Berechnung der Sekundärstrukturen der beiden Aptamere in Mfold wurde unter Berücksichtigung von 150 mM NaCl und einer Temperatur von 25 °C vorgenommen. Abbildung 2.1 zeigt die thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen von 6H7 und 6H5. Beide Sequenzen tendieren zu der Bildung eines *stem loops*, wobei der *loop* im Falle des 6H5-Aptamers mit über 20 beteiligten Nukleotiden größer ist

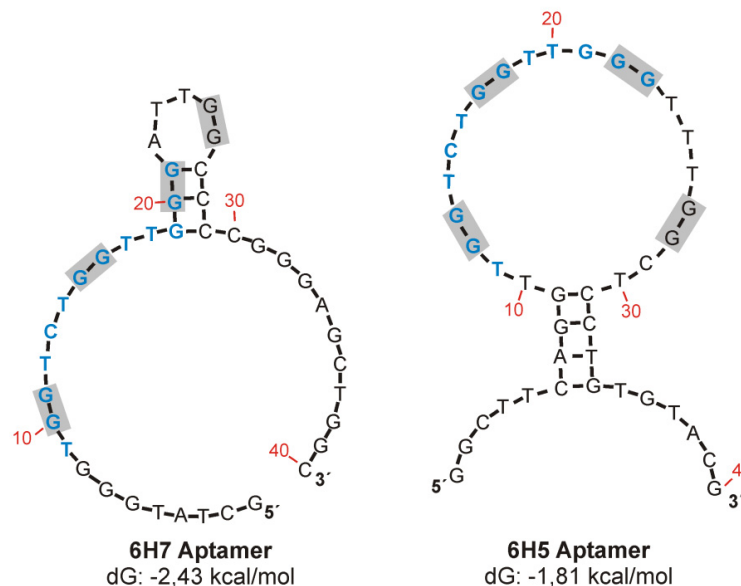


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen der Aptamere 6H7 und 6H5 gegen His-Tag mit Angabe der Freien Energien, berechnet in Mfold.

Beide Sequenzen weisen einen Abschnitt von 13 Nukleotiden mit identischer Sequenzabfolge (TGGTCTGGTTGGG, blau markiert) auf. Vermutlich spielt dieser Abschnitt eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Histidin-Tags von Proteinen. Aufgrund des hohen Anteils an Guaninen in beiden Aptamersequenzen ist das Vorliegen einer G-Quadruplexstruktur anzunehmen. Mithilfe des im Internet frei zugänglichen Programms QGRS-Mapper⁸ [136] können potentielle G-Quadruplexstrukturen anhand der

⁸ <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>

Oligonukleotidsequenzen vorhergesagt werden. In Abbildung 2.1 sind die Guanin-Moleküle grau unterlegt, welche laut dem QGRS-Mapper an der Ausbildung einer Quadruplexstruktur beteiligt sein könnten. Die an der Quadruplexstruktur beteiligten Guanine liegen zum größten Teil in der mittleren identischen Sequenzabfolge. Es ist anzunehmen, dass sich in Anwesenheit von monovalenten Ionen hier bevorzugt die Quadruplexstruktur ausbildet.

2.1.2 Aptamere gegen humanes F_c-Fragment

Die Selektion der Aptamere gegen humanes F_c-Fragment wurde von der Firma AptaRes (Mittelwalde) mithilfe der MonoLex-Methode in einem Tris-Puffer (Akmer-BP: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,3) durchgeführt. Zunächst wurden Aptamere gegen das aufgereinigte F_c-Fragment selektiert. Aus einem Pool von zehn bindenden Aptamersequenzen wurden die Aptamere 264, 265 und 266 anhand vorangegangener Bindungsstudien ausgewählt, welche dann in dieser Arbeit bezüglich ihrer Anwendbarkeit als Fänger- und Detektionsmoleküle in der Microarray-Technologie untersucht wurden.

Die drei Sequenzen sind jeweils 63 Nukleotide lang und besitzen identische Anfangs- bzw. Endbereiche, die sogenannten Primer-Regionen (blau markiert in Tabelle 2.1 und Abbildung 2.2), unterscheiden sich jedoch jeweils im mittleren Teil (Position 22-42). Bei Betrachtung der in Mfold berechneten wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen für die drei Aptamere bei 25 °C und Ionenkonzentrationen von 150 mM Na⁺ und 1 mM Mg²⁺ in Abbildung 2.2, ergibt sich für die Aptamere 264 und 265 die gleiche Struktur mit einer Freien Energie von -9,44 kcal/mol.

Die ermittelte Sekundärstruktur des Aptamers 266 unterscheidet sich von den anderen beiden. Im Falle der Aptamere 264 und 265 geht der mittlere Sequenzbereich unter diesen Bedingungen keinerlei Wechselwirkungen mit sich selbst ein, es entsteht somit ein einfacher *stem loop*. Das Aptamer 266 weist laut Mfold im mittleren Sequenzbereich hingegen mehrere Watson-Crick-Basenpaarungen auf, wodurch zwei *internal loops* entstehen. Aufgrund dieser zusätzlichen Stabilisierung ist die Freie Energie mit -12,65 kcal/mol niedriger als bei den Aptameren 264 und 265.

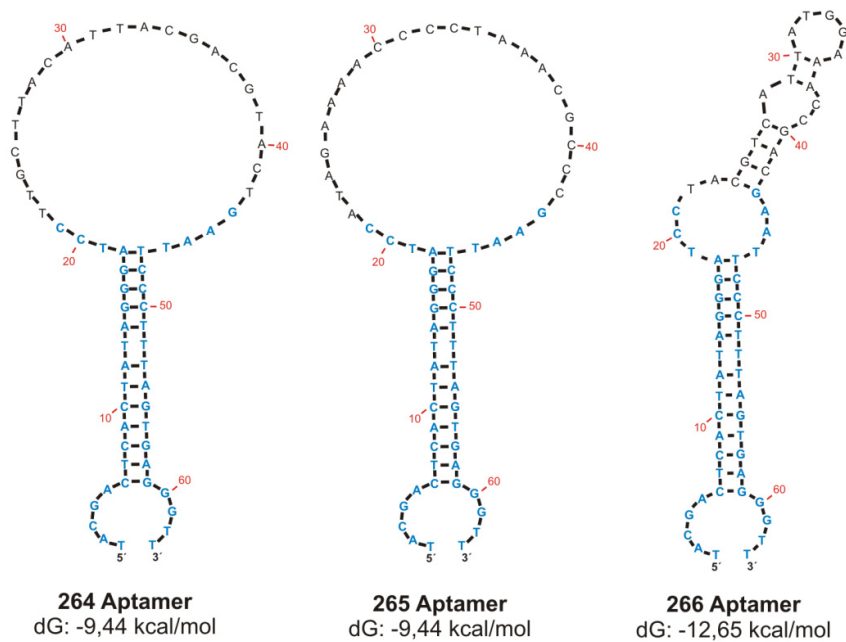


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen der Aptamere 264, 265 und 266 gegen humanes F_c-Fragment mit Angabe der Freien Energien, berechnet in Mfold.

Bei einer Erhöhung der Natriumionenkonzentration auf bis zu 1 μM nimmt in der theoretischen Berechnung für die drei Aptamere 264, 265 und 266 die Wahrscheinlichkeit der Bildung von *internal loops* und somit die Stabilität der gesamten Struktur zu (Daten nicht gezeigt). Dies macht die starke Abhängigkeit der Aptamerstruktur und somit auch der Targetbindung von der vorliegenden Konzentration an Ionen im Umgebungspuffer deutlich.

2.1.3 Aptamere gegen *vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Die Sequenzen der Aptamere V7t1 und del5_1 -selektiert in dem Tris-Puffer TBSTE (10 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 0,05% Tween 20 pH 7,0) gegen humanes VEGF₁₆₅ stammen aus Publikationen von Hasegawa *et al.* (2008) [64] und Nonaka *et al.* (2010) [34]. Das Besondere an den ausgewählten Aptameren ist, dass diese gegen unterschiedliche Bereiche des VEGF gerichtet sind. Aptamer V7t1 bindet an die Rezeptor-Bindungs-Domäne (RBD) mit einer Dissoziationskonstante von 1,4 nM und Aptamer del5_1 an die Heparin-Bindungsstelle (HBD) mit einer Dissoziationskonstante von 476,2 nM.

Die thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen der Aptamere V7t1 und del5_1 berechnet in Mfold bei 25 °C und einer Natriumkonzentration von 100 mM sind in Abbildung

2.3 dargestellt. Das mit nur 25 Nukleotiden wesentlich kleinere Aptamer V7t1 ist nahezu linear, nur ein kleiner *stem loop* kann sich laut Mfold unter diesen Bedingungen ausbilden. Mit einer Freien Energie von -3,16 kcal/mol weist das Aptamer del5_1 eine stabilere sekundäre Struktur auf. Hier bildet sich auch eine größere *stem loop* Struktur aus. Aufgrund der Spezifität der Aptamere zu unterschiedlichen Epitopen des VEGF₁₆₅ stellen diese eine vielversprechende Möglichkeit zur Entwicklung von Protein-Assays, insbesondere im Sandwich-Format, zur Detektion von VEGF₁₆₅ dar.

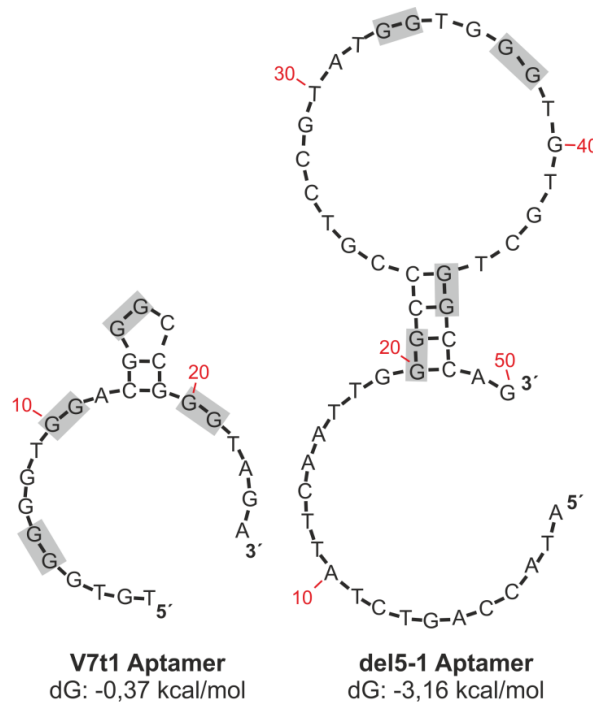


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der thermodynamisch günstigsten Sekundärstrukturen der Aptamere V7t1 und del5_1 gegen VEGF₁₆₅ mit Angabe der Freien Energien, berechnet in Mfold.

Beide Aptamersequenzen weisen potentielle Bereiche von G-Quadruplexstrukturen auf, die beteiligten Guanine sind in Abbildung 2.3 grau unterlegt. Mithilfe der CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie konnten Nonaka *et al.* (2008) die Ausbildung dieser G-Quadruplexstruktur nachweisen. Die Abbildung 2.4 zeigt die G-Quadruplexstruktur von V7t1.

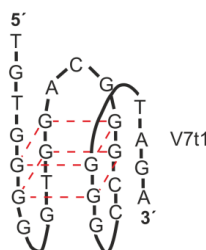


Abbildung 2.4 Mithilfe der CD-Spektroskopie ermittelte Struktur des Aptamers V7t1 [34].

2.2 Bereitstellung der Targetproteine

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Targetproteine hinsichtlich Ihrer Eigenschaften sowie ihrer Bereitstellung näher beschrieben. Die Proteine wurden teilweise kommerziell bezogen und zum Teil durch Klonierung des entsprechenden Gens in *E. coli* produziert und im Labormaßstab aufgereinigt.

2.2.1 His-getaggte Proteine

Der Polyhistidin-Tag ist ein weit verbreiteter Affinitäts-Tag und wird häufig an den C- oder N-Terminus eines Proteins fusioniert. Er ermöglicht eine leichte Aufreinigung und Detektion des Proteins. Somit könnten aptamerbasierte Microarrays, die in dieser Arbeit entwickelt werden sollen, die Detektion einer Vielzahl von getaggten Proteinen ermöglichen. Um die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden basierend auf den anti His-Tag Aptameren 6H7 und 6H5 zur Detektion unterschiedlicher Proteine zu bestätigen, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene His-getaggte Proteine verwendet.

Die His-getaggten Proteine PFEI (*pseudomonas fluorescens esterase I*), Bgl (β -Glucanase) und GFP (*green fluorescent protein*) wurden in *E. coli* produziert und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC: *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) aufgereinigt. Tabelle 2.2 zeigt die verwendeten Proteine mit Histidin-Tag und die entsprechenden *E. coli*-Stämme.

Tabelle 2.2 Auflistung der verwendeten His-getaggten Proteine und die Produktionsstämme.

Protein	Plasmid	Resistenz	Expression	Stamm	Größe in kDa
PFEI-his	pJOE2702 ⁹	Ampicillin	intrazellulär	<i>E. coli</i> K12	30
Bgl-his	pET-bgl-his ¹⁰	Ampicillin	extrazellulär	<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	26
GFP-his	pBADGFP _{his} ¹¹	Chloramphenicol	intrazellulär	<i>E. coli</i> One Shot TOP10	27

⁹ Herkunft: Universität Greifswald (Prof. Uwe T. Bornscheuer)

¹⁰ Herkunft: Universität Bielefeld (Prof. Dr. Karl Friehs)

¹¹ Herkunft: TCI Hannover (Doktorarbeit Michael Reck)

2.2.1.1 Produktion und Aufreinigung

Die Produktion der His-getaggtten Proteine fand im Labormaßstab in Schüttelkolben in 100 mL LB-Medium statt. Die Induktion wurde zwischen einer OD_{600} von 0,6 und 0,8 mit 1 mM IPTG für PFEI-his und Bgl-his und mit 1 mM L-Arabinose für GFP-his durchgeführt. Die Bakterien wurden nach der Kultivierung durch Zentrifugation sedimentiert. Mittels Ultraschallaufschluss wurden intrazellulär produziertes PFEI-his und GFP-his aus den *E. coli*-Zellen gewonnen. Im Falle des extrazellulär exprimierten Proteins Bgl-his wurde das Protein aus dem Kulturüberstand direkt aufgereinigt.

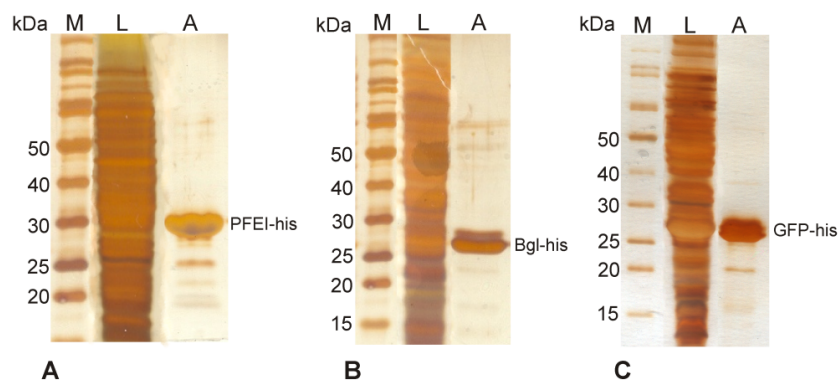


Abbildung 2.5 SDS-Gel-Analysen der aufgereinigten His-getaggtten Proteine (A) PFEI-his, (B) Bgl-his und (C) GFP-his. M: Proteinmarker, L: Protein im Zellysate, A: aufgereinigtes Protein (12%ige SDS-Gele, Silberfärbung).

Zur Aufreinigung der His-getaggtten Proteine wurde eine IMAC durchgeführt. Bei dem Chromatographiemedium handelte es sich um den Membranadsorber Sartobind IDA 75 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen), welcher mit Iminodiessigsäure (*iminodiacetic acid*, IDA) als Chelatbildner modifiziert ist. Zweiwertige Metallionen werden an diese Matrix immobilisiert und wechselwirken mit den Imidazolringen der Histidine. Zur Optimierung der Aufreinigung wurde zunächst in einem Screening mit Vivawell-8-Strips (Sartorius Stedim Biotech GmbH) im Mikrolitermaßstab für jedes Protein das am besten geeignete Metallion bestimmt. Es wurden vier verschiedene Metallsalzlösungen getestet: $NiSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$ und $CuSO_4$. Für alle drei Proteine zeigte die Anwendung von Cobalt die besten Ergebnisse hinsichtlich der Qualität sowie Quantität der Aufreinigung. Die Proteine wurden anschließend im Millilitermaßstab mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) aufgereinigt. Die Abbildung 2.5 zeigt die hergestellten und aufgereinigten His-getaggtten Proteine im SDS-Gel.

2.2.1.2 Cy3-Markierung

Die Markierung der Proteine mit dem Farbstoff Cy3 wurde mit dem Cy3-Mono-Reactive Dye (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) durchgeführt. Die Farbstoffe binden über einen NHS-Ester an primäre Aminogruppen der Proteine. Anschließend ist eine Bestimmung der Markierungseffizienz, also des Verhältnisses von Farbstoff zu Protein (*dye-to-protein ratio*, D/P-Ratio), notwendig. Zu geringe Mengen an gebundenem Cy3 führen zu schwachen Signalen, zu hohe Mengen an Cy3 können die Epitope des Proteins sterisch beeinflussen, aber auch den dynamischen Bereich des Microarrays verkleinern. Da sowohl der Anregungs- als auch Emissionsbereich des GFP nicht im Bereich des verwendeten Fluoreszenz-Scanners liegt, wurde GFP ebenfalls Cy3-markiert. Die D/P-Ratios der Proteine wurde mithilfe des Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Es wurden für alle drei Proteine D/P-Ratios von 0,7 bis 0,8 erzielt [137].

2.2.2 Immunoglobulin G (IgG)

Bei Immunoglobulinen handelt es sich um Antikörper, welche von B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems produziert werden. Prinzipiell haben Antikörper die Aufgabe, Moleküle eines Antigens spezifisch zu binden und in Wechselwirkung mit anderen Zellen und Molekülen des Immunsystems zu treten, um die gebundenen Fremdkörper zu eliminieren. Die Besonderheit von Antikörpern ist ihre Fähigkeit, Moleküle mit hoher Affinität zu binden. Es gibt verschiedene Isotypen der Immunoglobuline (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE), welche sich in der Struktur der schweren Ketten unterscheiden. Immunoglobulin G (IgG) stellt mit einem Anteil von 70-75% des gesamten Immunoglobulinpools im menschlichen Serum den häufigsten Isotyp dar.

Die Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Pharmazeutika. Aus diesem Grund wird ständig nach neuen, innovativen Verfahren zum Monitoring von Bioprozessen sowie geeigneten Fängermolekülen in der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern gesucht. Bisher wird in erster Linie Protein A als Affinitätsligand eingesetzt. Dieses Protein bindet spezifisch an das F_c-Fragment verschiedener Immunoglobuline. Die in dieser Arbeit entwickelten

aptamerbasierten Methoden zur Detektion von Immunoglobulinen sollen die potentielle Anwendbarkeit von Aptameren im Monitoring und in der Antikörperaufreinigung zeigen.

Um die Gruppenspezifität der anti F_c-Aptamere zu untersuchen wurden verschiedene Targetproteine herangezogen: IgG1-IgG4, polyklonales humanes IgG, Maus IgG, Ratte IgG, Ziege IgG und humanes F_c-Fragment (Dianova).

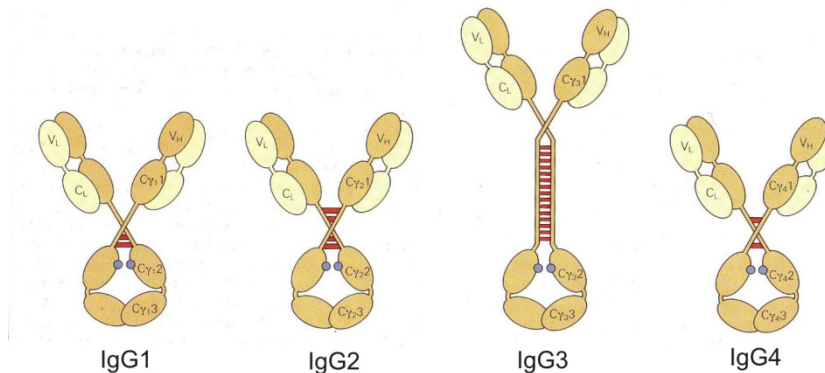


Abbildung 2.6 Darstellungen der Strukturen der vier verschiedenen Unterklassen des Immunoglobulins G. Die relative Verteilung der Unterklassen im humanen IgG ist 66:23:7:4 [138].

Die Strukturen der vier Unterklassen des IgG (IgG1-4) unterscheiden sich in der Anzahl und Verteilung der Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten (Abbildung 2.6). Im Falle von IgG1 und IgG4 sind die Ketten durch zwei, bei IgG2 durch vier und bei IgG3 durch 13 Disulfidbrücken in der Gelenkregion (*Hinge*-Region) verbunden.

2.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein humaner Wachstumsfaktor und gehört zur Klasse der Cystinknoten-Wachstumsfaktoren (*cystine knot growth factors*). Bei dieser Art von Biomolekülen handelt es sich um homodimere Proteine, welche einen Cystinknoten in ihren Monomerstrukturen aufweisen. Unter dem Cystinknoten wird eine Struktur aus zwei Cystinmolekülen, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, verstanden. Das VEGF besteht aus zwei solchen Monomereinheiten, welche über intermolekulare Disulfidbrücken antiparallel verbunden sind (Abbildung 2.7). Zur VEGF-Familie gehören VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF (*placental growth factor*). Diese Varianten unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion.

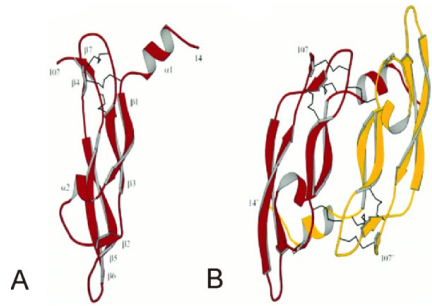


Abbildung 2.7 Darstellungen der Monomerstruktur (A) und Dimerstruktur (B) des VEGF-A [139].

Von VEGF-A existieren verschiedene Isoformen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Aminosäuren (u.a. 121, 138, 165). Diese Varianten entstehen aus dem Gen des VEGF-A durch alternatives Splicing. Das alternative Splicing ist ein in eukaryotischen Zellen natürlich vorkommender Mechanismus, mit dem aus ein und demselben Gen verschiedene mRNAs und somit Proteine generiert werden können.

VEGF-A ist ein wichtiger Regulator der Angiogenese. Die Angiogenese bezeichnet die Ausbildung von neuen Blutgefäßen, was insbesondere bei der Wundheilung von Bedeutung ist. Da VEGF-A ebenfalls die Gefäßneubildung bei Tumoren fördert, ist der Gehalt an VEGF-A ein messbarer Indikator zur Früherkennung eines Tumors [34]. Diese Tatsache macht die Entwicklung eines Assays zur Detektion von VEGF besonders interessant. Insbesondere da bereits eine Vielzahl an Aptameren gegen VEGF publiziert sind [85, 140-142], stellt der Aufbau eines aptamerbasierten Bioassays zur Detektion von VEGF eine vielversprechende Möglichkeit, u.a. in der Tumordiagnostik, dar. Eines der bekanntesten Aptamere gegen VEGF ist Pegaptanib und wurde bereits 2004 als Medikament zur Behandlung der altersabhängigen Makula-Degeneration zugelassen. Dabei handelt es sich um ein RNA-Aptamer, welches gezielt den Wachstumsfaktor VEGF bindet und somit die beeinträchtigende Gefäßneubildung im Auge inhibiert [18, 143-145].

Das VEGF₁₆₅ mit 165 Aminosäuren ist die am häufigsten exprimierte Form des VEGF. Das Monomer ist 22,3 kDa groß [146] und besteht aus zwei Domänen, einer Rezeptor-Bindungsstelle (RBD) und einer Heparin-Bindungsstelle (HBD).

2.2.3.1 Rekombinante Produktion von VEGF₁₆₅

Für den Aufbau und die Optimierung des Aptamer-Microarrays zur Detektion von VEGF₁₆₅ wird das Protein in reiner Form benötigt. Hierzu wurde die biotechnologische Herstellung und

Aufreinigung von VEGF₁₆₅ vorangetrieben, indem ausgehend vom Vektor einer CHO-Suspensionszelllinie zur Expression von VEGF₁₆₅ (pRRL.PPT.SF.VEGF165.pre)¹² die Klonierung des VEGF₁₆₅-Gens in einen geeigneten Expressionsvektor für *E. coli* durchgeführt wurde. Die Kultivierung von *E. coli* ist zum einen weniger aufwendig als die Arbeit mit tierischen Zellen, zum anderen werden Proteine in *E. coli* in größeren Mengen produziert.

Zur Produktion von VEGF₁₆₅ in *E. coli* wurde das pET-Vektorsystem (*plasmid expression by T7-RNA-Polymerase*) von Merck genutzt. Die entsprechenden Vektoren zeichnen sich durch eine sehr hohe Transkriptionseffizienz aus und sind daher besonders für eine starke Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* geeignet. Abbildung 2.8 zeigt die Kontrollelemente des pET-Systems in einem geeigneten *E. coli*-Wirtstamm.

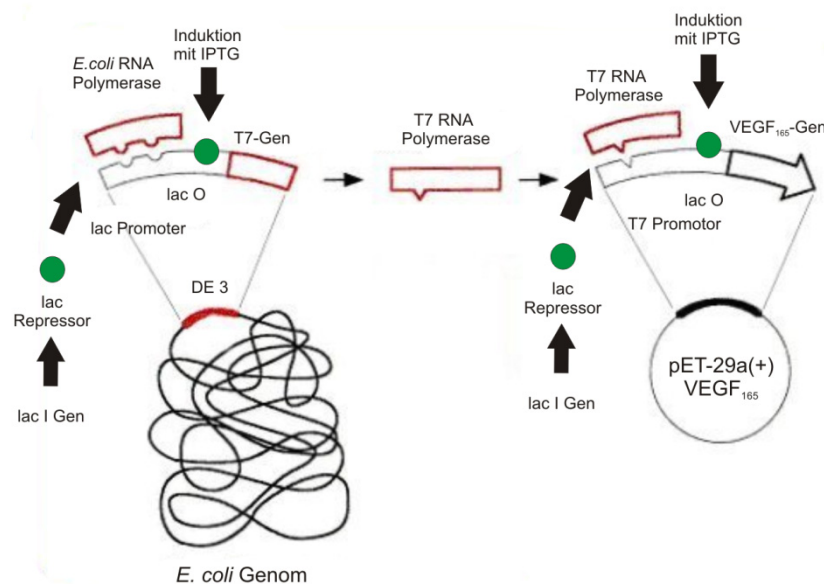


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Kontrollelemente des pET-Systems in *E. coli*.

Eine Besonderheit des Systems besteht in der Möglichkeit einer induzierbaren Proteinexpression. Zur Produktion von Proteinen müssen pET-Vektoren in einen speziellen *E. coli*-Stamm transformiert werden, welcher das Gen für die Produktion der viralen T7-RNA-Polymerase, das so genannte λ DE3-Lysogen, in seinem Genom aufweist. Die T7-RNA-Polymerase ist ein Enzym, das an den T7-Promotor des eingeführten Produktionsvektors bindet und die Transkription des Zielgens durchführt. Um eine vorzeitige Produktion des Zielproteins zu unterbinden, beinhaltet das System einen Mechanismus zur Repression mithilfe des *lacI*-Gens. Diese Repression ist insbesondere bei der Produktion von Proteinen,

¹² Herkunft: Medizinische Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Schambach)

die für den Wirt toxisch sind, unverzichtbar. Das rekombinante *E. coli* Genom enthält das *lacI*-Gen, welches für die Produktion des *lac*-Repressors sorgt. Der *lac*-Repressor bindet an *lac*-Operatorregionen direkt hinter den Promotoren des Gens der T7-Polymerase und des Zielgens und unterdrückt damit die Transkription dieser Gene in mRNA. Durch die Kontrolle beider Gene über diesen *lac*-Repressor wird die Produktion des Zielproteins erstens direkt und zweitens indirekt durch Repression des T7-Polymerasegens höchst effektiv unterbunden. Da die Produktion der mRNA durch Repression grundsätzlich nie vollständig unterbunden werden kann, ist in den speziellen Zellen als zusätzliche Blockierungsmöglichkeit ein Gen vorhanden, welches für die Produktion von T7-Lysozym sorgt. Dieses Lysozym bindet an die T7-RNA-Polymerase und inaktiviert diese.

Wird den Zellen der Induktor IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zugeführt, bindet es an den *lac*-Repressor und verhindert seine Bindung an die Operatorregion. Die Bildung der T7-RNA-Polymerase und somit des Zielproteins erfolgt nun ungehindert.

Die beiden folgenden Abschnitte beschreiben die verwendete Klonierungsstrategie sowie die Produktion und Aufreinigungsansätze des VEGF₁₆₅.

2.2.3.2 Klonierungsstrategien

Mittels zweier Klonierungsstrategien sollte die Produktion von S-getagtem VEGF₁₆₅ und unmodifiziertem VEGF₁₆₅ in *E. coli* realisiert werden. Der S-Tag ist eine Kette von 15 Aminosäuren und bindet mit hoher Affinität an S-Protein. Unter Verwendung spezieller Kits von Merck dient dieser Tag zur Aufreinigung des Zielproteins [147]. Die Klonierung des VEGF₁₆₅-Gens wurde über kohäsive Enden (*sticky ends*) durchgeführt. Die Abbildung 2.8 zeigt die beiden Klonierungsstrategien. In einem ersten Schritt fand eine Subklonierung des VEGF-Gens in den Vektor pGEM-5Zf(+) statt. Dieser Vektor ist ein *high-copy*-Vektor und ist daher besonders zur Vervielfältigung von Plasmiden geeignet. Anschließend wurde das VEGF-Gen in den Zielvektor pET-29a(+), welcher speziell für die Produktion von Proteinen in *E. coli* geeignet ist, einkloniert.

Das Klonierungsinsert wurde mittels PCR (*polymerase chain reaction*) mit dem Plasmid pRRL.PPT.SF.VEGF165.pre als Template generiert, wobei mit den Primern geeignete Restriktionsschnittstellen (NdeI und PstI) an die Enden des Inserts angebracht wurden. Die

Sequenz des Klonierungsinserts ist im Anhang auf Seite 130 zu finden. Um passende Ligationsstellen zu generieren, wurden das Insert sowie der Vektor pGEM-5Zf(+) mit den Restriktionsenzymen NdeI und PstI geschnitten. Die erhaltenen Bruchstücke wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Durch Ausschneiden der Banden konnten diese separat aufgereinigt werden. Mittels anschließender Ligation des Klonierungsinserts mit dem linearisierten Vektor unter Verwendung der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C wurde das Zielgen in den pGEM-Vektor eingebracht (Abbildung 2.9). Die pGEM-Vektoren wurden in JM 109-Zellen vervielfältigt und aufgereinigt.

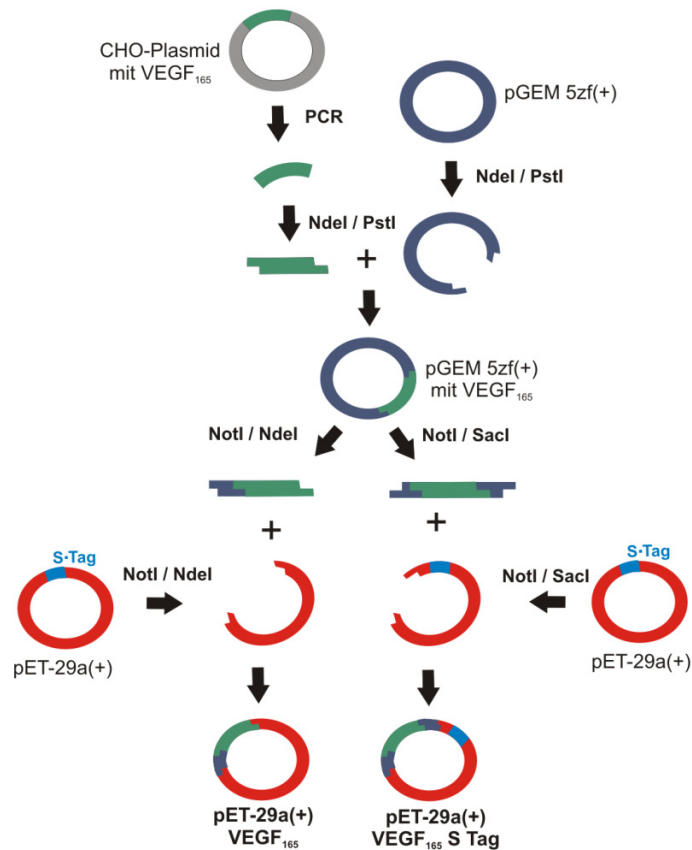


Abbildung 2.9 Klonierungsstrategie zur Klonierung von VEGF₁₆₅ in pET-29a(+).

Als Zielvektor wurde aufgrund geeigneter Schnittstellen im Bereich der *multiple cloning sites* der Vektor pET-29a(+) gewählt. Ausgehend von dem pGEM-5Zf(+)-Vektor mit VEGF wurde das VEGF₁₆₅-Gen über die Schnittstellen NotI und NdeI bzw. über die Schnittstellen NotI und SacI in den Zielvektor kloniert. Als Resultat wurden zwei verschiedene pET-VEGF₁₆₅-Vektoren erhalten.

Bei Verwendung der Schnittstellen NotI und NdeI wurde ein Vektor generiert, welcher nur das Zielgen VEGF unter Kontrolle des T7-Promotors aufweist. Durch den Einsatz von SacI statt NdeI als zweites Restriktionsenzym wurde die im Zielvektor vorliegende Gensequenz für den S-Tag nicht herausgeschnitten. VEGF wurde so in den Vektor ligiert, dass es sich stromaufwärts der S-Tag-Sequenz befindet. Das Startcodon vor dem S-Tag, die *cleavage site* und das eigentliche VEGF-Gen mit seinem Stoppcodon befinden sich dadurch in einem gemeinsamen offenen Leseraster und werden zu einer mRNA transkribiert, welche in das getaggte Fusionsprotein translatiert wird.

Die generierten pET-Vektoren wurden zunächst in *E. coli* JM109-Zellen transformiert. Diese Zellen wurden zur Vervielfältigung des Plasmids eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag einzelne Klone gepickt. Jeder Klon wurde dabei vor Verwendung mittels Kolonie-PCR überprüft, um sicher zu stellen, dass das Plasmid eingeschleust wurde, welches das Zielgen enthält. Nach Plasmidisolation wurde der Erfolg der Klonierung mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die Abbildung 2.10 zeigt den Restriktionsverdau der unveränderten Vektoren pGEM-5Zf(+) und pET-29a(+) (gekennzeichnet mit P) und der entsprechenden Vektoren mit VEGF₁₆₅ (PV). Zusätzlich wurde aus den VEGF-Vektoren das VEGF-Gen unter Verwendung von zwei Restriktionsenzymen herausgeschnitten, was jeweils in der Spur PV2 aufgetragen wurde.

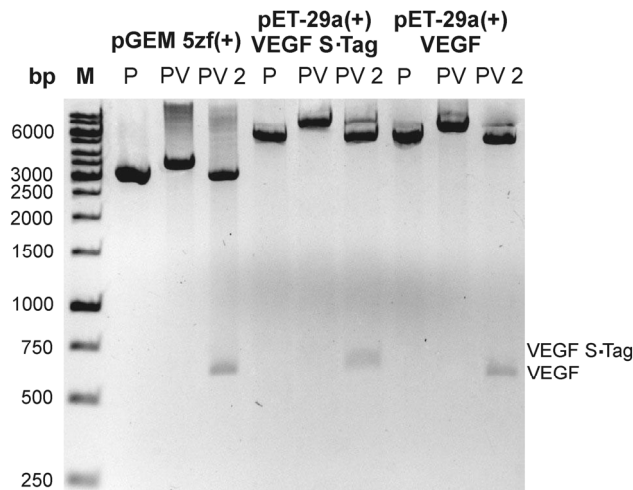


Abbildung 2.10 Agarosegel-Analyse des Restriktionsverdaus der Vektoren pGEM-5Zf(+) und pET-29a(+) jeweils ohne (P) und mit VEGF (PV). In den Spuren PV2 sind jeweils die Bruchstücke der Vektoren aufgetragen, aus welchen das VEGF-Gen heraus geschnitten wurde.

Anhand des Restriktionsverdau ist deutlich der Erfolg der Klonierung zu erkennen. Der originale pGEM-5Zf(+)-Vektor hat eine Größe von 3000 bp und der pET-Vektor eine Größe von 5371 bp. Da das VEGF-Gen eine Größe von ca. 600 Basenpaaren aufweist, wandern die Vektoren, welche das VEGF-Gen enthalten langsamer im Gel (Spur PV). Durch Schneiden der Vektoren mit den beiden Enzymen mit denen VEGF einkloniert wurde, wurde das VEGF-Gen herausgeschnitten und erscheint im Gel als Bande bei 600 bp (Spur PV2).

Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten den Erfolg der Klonierung. Aus den erhaltenen Daten wurden die Vektorkarten der beiden Plasmide in Vector NTI Advance 11 erstellt (Abbildung 2.11 und 2.12).

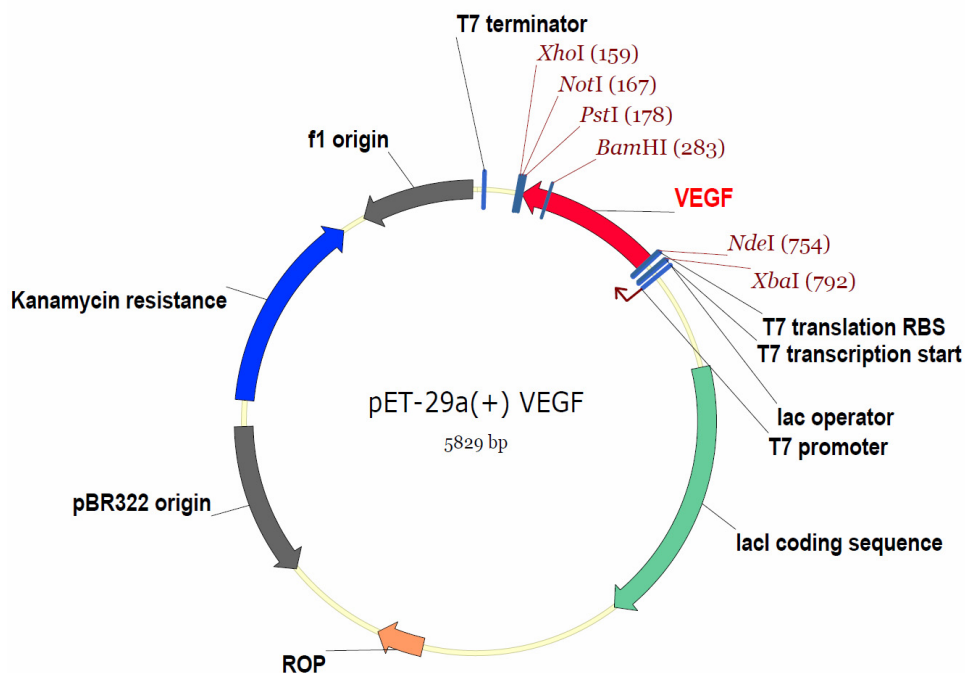


Abbildung 2.11 Vektorkarte des pET-29a(+) VEGF-Vektors.

Der Vektor pET-29a(+) besitzt eine Kanamycin-Resistenz, sowie einen hier nicht genutzten His-Tag-kodierenden Bereich hinter dem Stopcodon des VEGF₁₆₅-Gens. Ebenso enthält der Vektor eine Gensequenz zur Einführung eines S-Tags an das herzustellende Protein. Dieser Genabschnitt ist im Falle des pET-29a(+) VEGF-Vektors nicht mehr vorhanden (Abbildung 2.10). Der in Abbildung 2.12 dargestellte Vektor besitzt diese S-Tag kodierende Sequenz. Hier folgt dem T7-Promotor ein offener Leseraster für das Protein mit der S-Tag-Sequenz, einer *thrombin cleavage site* sowie dem VEGF-Gen.

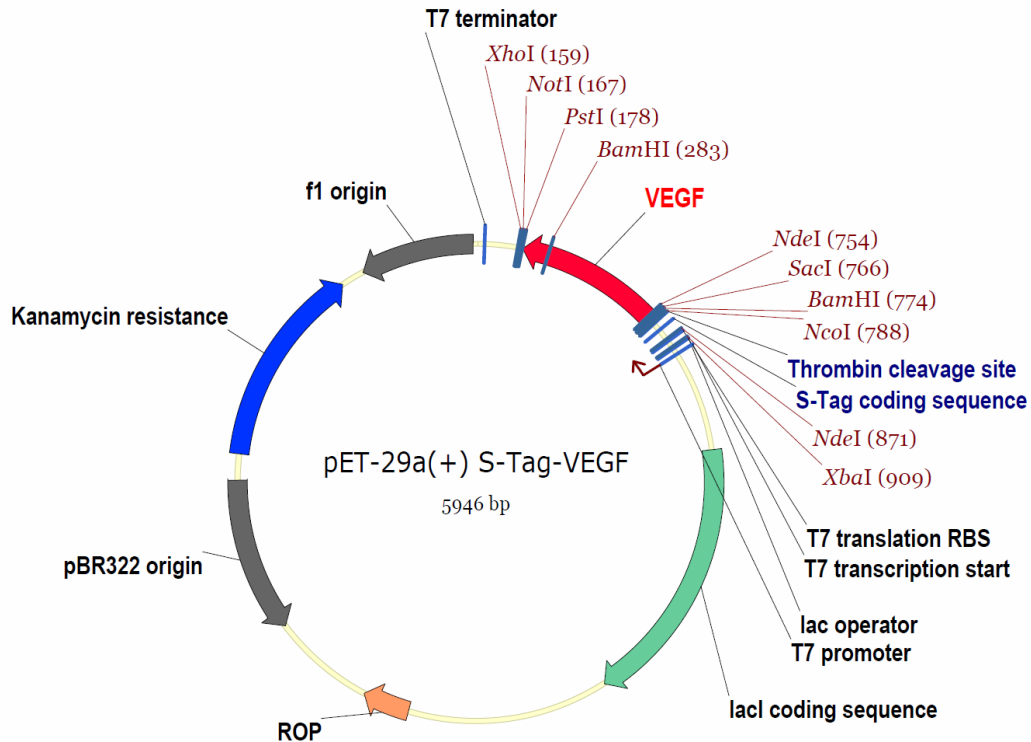


Abbildung 2.12 Vektorkarte des pET-29a(+) VEGF S-Tag-Vektors.

2.2.3.3 Expression von VEGF₁₆₅

Die beiden pET-VEGF-Vektoren wurden aus den JM109-Zellen mittels Plasmidpräparation isoliert und in *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS-Zellen (Merck KGaA) transformiert. Diese Zellen sind Derivate des *E. coli* BL21-Stamms und sind besonders für die rekombinante Produktion humaner Proteine geeignet. Die Rosetta-Zellen unterscheiden sich von den BL21-Zellen insbesondere durch ein zusätzliches Plasmid mit Chloramphenicolresistenz für die Produktion von tRNAs, welche in *E. coli* kaum vorhanden sind. Eine durchgeführte *codon usage* Analyse (Graphical Codon Usage Analyser, <http://gcu.schoedl.de/>) hat ergeben, dass das Gen VEGF₁₆₅ Codons enthält, für die in *E. coli* nur minimale Mengen an tRNA produziert werden. Daher ist dieses Plasmid für die Produktion des VEGF essentiell. Um eine ständige Weitergabe dieses Plasmids in *E. coli* zu gewährleisten, ist neben der Zugabe von Kanamycin auch die Zugabe von Chloramphenicol während der Kultivierung nötig. Die Tabelle 2.3 zeigt eine Übersicht der beiden hergestellten VEGF-Proteine.

Das VEGF₁₆₅ besteht normalerweise aus 165 Aminosäuren. Für den Transport in humanen Zellen besitzt der offene Leseraster von VEGF₁₆₅ aber zusätzlich eine Signalpeptidkette, bestehend aus 26 Aminosäuren. Diese Sequenz wird in humane Zellen abgespalten, in *E. coli*

findet dieser Prozess jedoch nicht statt. Daher beläuft sich die Anzahl der Aminosäuren im Monomer des VEGF insgesamt auf 191 und im Falle des VEGF mit S-Tag auf 230 Aminosäuren, was einer molaren Masse von 23 bzw. 27 kDa entspricht.

Tabelle 2.3 Auflistung der hergestellten VEGF-Proteine und der Produktionsstämme.

Protein	Plasmid	Resistenz	Expression	Stamm	kDa
VEGF ₁₆₅	pET-29a(+)	Kanamycin / Chloramphenicol	Intrazellulär (<i>Inclusion Bodies</i>)	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)pLysS	23
VEGF ₁₆₅ S-Tag	pET-29a(+)	Kanamycin / Chloramphenicol	Intrazellulär (<i>Inclusion Bodies</i>)	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)pLysS	27

Sämtliche Kultivierungen wurden in Schüttelkolben in 100 mL LB-Medium durchgeführt. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 wurde mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Um zu überprüfen, ob das VEGF nach Induktion in *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS transkribiert wird, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (0 h, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h) Proben entnommen, abzentrifugiert und aus den erhaltenen Zellpellets die RNA isoliert. Die Gesamt-RNA wurde in cDNA revers transkribiert und anschließend mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Primern das Vorhandensein der mRNA des VEGF₁₆₅-Gens nachgewiesen. Die Agarose-Gele mit den entsprechenden Proben sind in Abbildung 2.13 dargestellt.

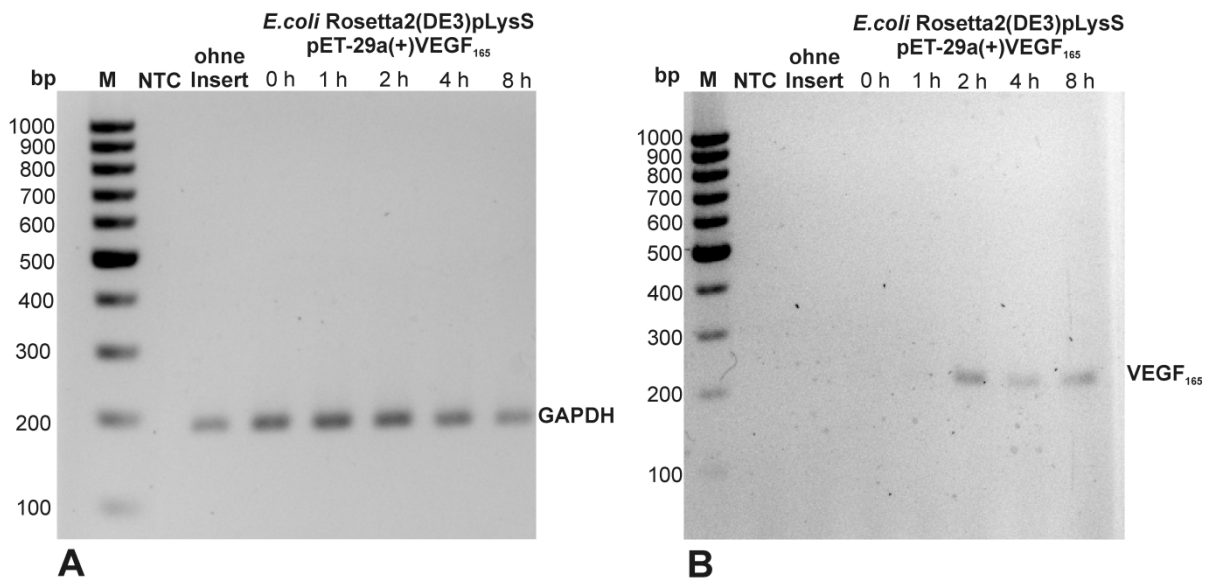


Abbildung 2.13 Agarosegelanalysen der erhaltenen Produkte der RT-PCR der Gesamt-RNA zum Nachweis der Expression des VEGF-Gens. (A) GAPDH (Haushaltsgen-Gen, interne Referenz) und (B) VEGF. Aufgetragen sind M: Marker, NTC: *No Template Control*, pET-29a(+) ohne Insert (VEGF) und mit Insert 0 h, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion.

Für alle RT-PCR wurde die gleiche Menge an Gesamt-RNA eingesetzt. Als interne Referenz diente das Haushaltsgen GAPDH. Abbildung 2.13A zeigt eine stabile Expression von GAPDH bei 200 bp. Die Intensität der Banden und damit die Konzentration der mRNA für VEGF in Abbildung 2.13 B bei ca. 230 bp nimmt hingegen mit der Zeit zu. Während GAPDH in allen Proben erfolgreich nachgewiesen werden konnte, ist die mRNA des VEGF nur 2 h, 4 h und 8 h nach Induktion in den Proben vorhanden. Dieses Ergebnis bestätigt die Transkription des Zielgens in *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS nach Induktion.

Rekombinante Proteine werden in *E. coli* häufig in Form von unlöslichen Proteinaggregaten, so genannten *Inclusion Bodies*, gebildet. Aus diesem Grund fand der Nachweis von VEGF₁₆₅ auf Proteinebene sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion statt. Hierzu wurden Rosetta-Zellen jeweils vor der Induktion sowie 4 h und 6 h nach Induktion geerntet. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die beiden Fraktionen mit SDS-PAGE untersucht. In Abbildungen 2.14 A und B sind die Gele nach der Silberfärbung dargestellt.

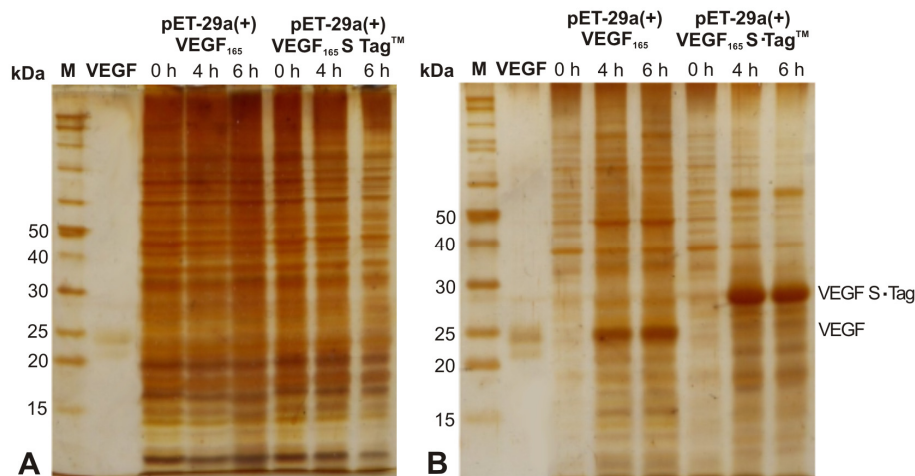


Abbildung 2.14 SDS-PAGE-Analysen der (A) löslichen und (B) unlöslichen Fraktionen von pET-29a(+)-VEGF₁₆₅ und pET-29a(+)-VEGF₁₆₅ S-Tag jeweils 0 h, 4 h und 6 h nach Induktion mit IPTG. M: Proteinmarker, VEGF: kommerzielles VEGF₁₆₅ (16%ige SDS-Gele, Silberfärbung).

Während in den löslichen Fraktionen keinerlei Überexpression von VEGF nachgewiesen werden kann (Abbildung 2.14A), ist in der unlöslichen Fraktion nach Induktion VEGF nachweisbar (Abbildung 2.14B). Da die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wird, werden die Disulfidbrücken der Proteine zerstört. Aus diesem Grund tauchen in dem Gel nur die Banden der VEGF-Monomere auf. Das berechnete

Molekulargewicht des VEGF₁₆₅-Monomers beträgt 22,51 kDa und des VEGF₁₆₅ mit S-Tag 26,78 kDa. Die SDS-PAGE in Abbildung 2.14 bestätigt dies.

Zur eindeutigen Identifikation des VEGF im Zelllysats wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Mithilfe eines Western-Blots können unter Verwendung spezifischer Antikörper Proteine sicher nachgewiesen werden. Hierbei werden mithilfe eines elektrischen Felds die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bzw. Proteinmischungen auf eine Trägermembran (z.B. Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)) transferiert. Anschließend findet die Inkubation der immobilisierten Proteine mit einem spezifischen Primärantikörper statt. Dieser wird wiederum mithilfe eines Sekundärantikörpers detektiert und über eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

Für die Detektion des VEGF wurde das Western Breeze Chromogenetic Western Blot Immunodetection Kit (anti *rabbit*) von Invitrogen in Kombination mit einem Primärantikörper gegen humanes VEGF₁₆₅ (Dianova) verwendet. Die Abbildung 2.15 zeigt einen Scan des durchgeführten Western Blots und das entsprechende SDS-Gel. In beiden unlöslichen Fraktionen (Bande 1 und 2) konnte VEGF bzw. VEGF S-Tag nachgewiesen werden.

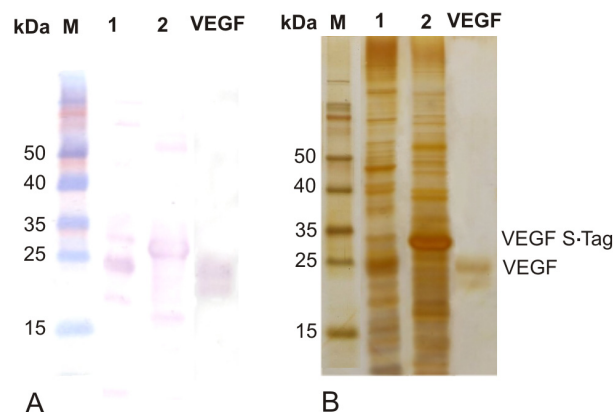


Abbildung 2.15 (A) Western-Blot und (B) SDS-PAGE-Analyse zum Nachweis von VEGF in den unlöslichen Fraktionen des Zelllysats. M: Proteinmarker, 1: pET-29a(+) VEGF₁₆₅ 4 h nach Induktion, 2: pET-29a(+) VEGF₁₆₅ S-Tag 4 h nach Induktion, VEGF: kommerzielles VEGF₁₆₅ (16 %iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Da VEGF₁₆₅ nur in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte, liegt das Protein in so genannten Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*) vor. Bei *Inclusion Bodies* handelt es sich um Akkumulationen von Proteinen im Zellinneren. Dies tritt häufig bei der Expression von humanen Genen in prokaryotischen Zellen auf [148]. Ein großer Nachteil der *Inclusion Bodies* ist, dass das hergestellte Protein zum größten Teil nicht korrekt gefaltet vorliegt. Somit

sind aufwendige Protokolle zum Lösen und Falten des Proteins notwendig. Trotz dieser aufwendigen Isolierung der Proteine birgt die Bildung von *Inclusion Bodies* einige Vorteile gegenüber der Ansammlung des Zielproteins in der cytoplasmatischen Fraktion der Zelle. Zum einen sind Proteine in *Inclusion Bodies* oft weniger anfällig gegenüber Proteasen, zum anderen kann das Zielprotein bereits vor der eigentlichen Aufreinigung durch Abtrennung der löslichen Fraktion von einem Großteil der natürlichen *E. coli* Proteine separiert werden [149, 150].

Die verwendeten Strategien zur Freisetzung des VEGF₁₆₅ aus den *Inclusion Bodies* werden neben der Aufreinigung von VEGF₁₆₅ im nächsten Abschnitt erläutert.

2.2.3.4 Aufreinigung von VEGF₁₆₅

Zur Aufreinigung und Faltung des hergestellten VEGF₁₆₅ wurden verschiedene Ansätze untersucht. Die Aufreinigung des ungetaggen VEGF fand mithilfe von Kationenaustauschchromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie statt. Zum anderen wurde das S-getaggte VEGF mithilfe des bereits erwähnten kommerziell erhältlichen Kits (S•Tag™ Thrombin Purification Kit, Merck KGaA) aufgereinigt. Im Folgenden werden die drei Methoden und die entsprechenden Ergebnisse vorgestellt.

Kationenaustauschchromatographie (IEX)

Der isoelektrische Punkt des VEGF₁₆₅ liegt bei 6,9 [150]. Zur Aufreinigung des Proteins über Kationenaustauschchromatographie (IEC, *ion exchange chromatography*) wurde daher ein Bindungspuffer mit einem pH-Wert von 5,5 gewählt, um eine positive Gesamtladung und somit eine Bindung des VEGF an das Säulenmaterial zu gewährleisten. Zum Aufschließen der VEGF-*Inclusion Bodies* wurde das Protokoll von Siemeister *et al.* (1996) [150] verwendet. Die gewaschenen *Inclusion Bodies* wurden vor der Chromatographie in einem Puffer, u.a. bestehend aus Harnstoff und DTT (Dithiothreitol) bei pH 5,5 aufgenommen. Genaue Zusammensetzung der Puffer sind im Anhang ab Seite 143 zu finden. Das DTT dient dabei zur Reduktion von Disulfidbrücken und begünstigt somit die Solubilisierung des VEGF. Die Probe wurde auf eine Sartobind S75 Membran (Sartorius Stedim Biotech) aufgetragen und die Elution des VEGF₁₆₅ erfolgte über einen ansteigenden Ionenstärkegradienten (bis 300 mM) an Natriumchlorid.

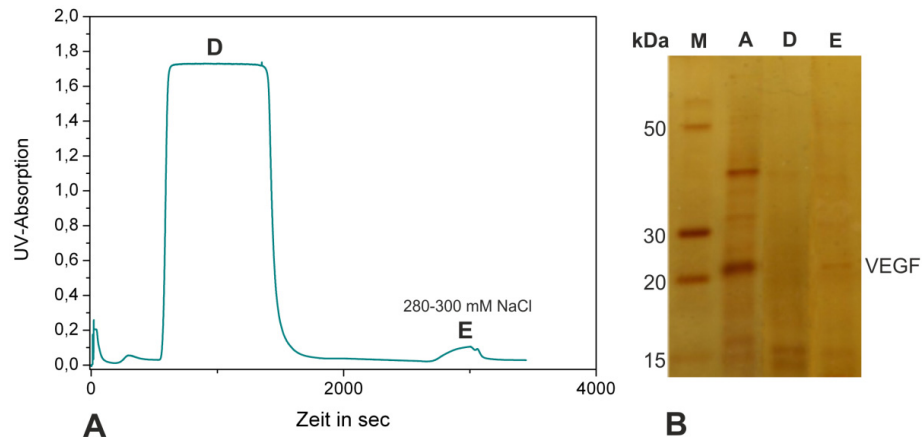


Abbildung 2.16 FPLC-Aufreinigung des VEGF₁₆₅ über Kationenaustauschchromatographie. Dargestellt sind (A) das Chromatogramm mit der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Zeit und (B) die SDS-Gel-Analyse ausgewählter Fraktionen. M: Proteinmarker, A: Ausgangsprobe, D: Durchlauf, E: Elution (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Das Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie in Abbildung 2.16 A zeigt im Vergleich zum Durchlauf nur einen sehr kleinen Elutionspeak, welcher ab einer Natriumchloridkonzentration von 280 nM auftrat. Im SDS-Gel in Abbildung 2.16 B ist im Durchlauf insgesamt wenig Protein zu erkennen, die Elution zeigt auf Höhe des VEGF eine sehr schwache Bande. Das hergestellte VEGF konnte also nur in geringer Menge eluiert werden. Vermutlich binden alle Proteine der Probe sehr stark an die Membran und werden durch anschließendes Waschen unvollständig abgetrennt. Auffällig ist, dass das VEGF schon in der Ausgangsprobe (A) sehr rein ist. Somit konnte der Vorteil der Proteinproduktion in *Inclusion Bodies* durch die Entfernung der löslichen Fraktion bestätigt werden.

Zur Verbesserung dieser Aufreinigungsstrategie könnten weitere Bindungspuffer und pH-Werte getestet werden. Ebenso könnte eine Variation des Elutionsschrittes, beispielweise über einen pH-Shift, zur erhöhten Elution des VEGF beitragen.

Heparin-Affinitätschromatographie

Da VEGF₁₆₅ eine Heparin-Bindungsdomäne aufweist [151, 152], konnte das hergestellte Protein über Affinitätschromatographie mit einer Heparinaffinitätssäule (HiTrapTM Heparin HP, GE Healthcare) aufgereinigt werden. Hierzu wurden die gewaschenen VEGF-*Inclusion Bodies* nach dem Protokoll von Heiring *et al.* (2001) [149] in 7,5 M Harnstofflösung aufgenommen und zehnfach verdünnt in eine Lösung aus 20 mM Tris-HCl und 7 μ M CuCl₂ (pH 8,4). Die VEGF-Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch die

aprupte Verdünnung wird die „korrekte“ Faltung des VEGF erreicht [153]. Hierbei verschiebt sich das Faltungsgleichgewicht vom denaturierten zum nativen Zustand. Anschließend wurde die Probe auf die Heparinsäule gegeben und mithilfe eines NaCl-Gradienten (bis 2 M) eluiert.

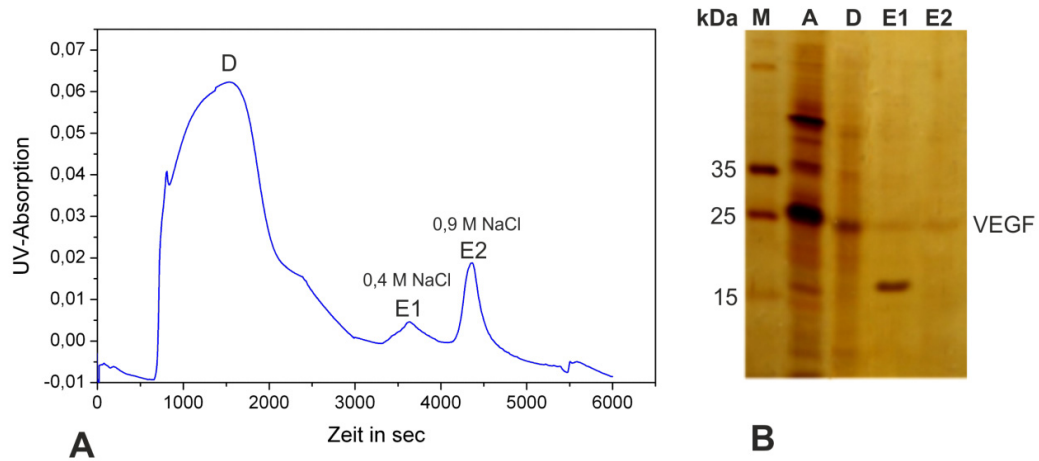


Abbildung 2.17 FPLC-Aufreinigung des VEGF₁₆₅ über eine Heparin-Affinitätssäule. Dargestellt sind (A) das Chromatogramm mit der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Zeit und (B) die SDS-Gel-Analyse ausgewählter Fraktionen. M: Proteinmarker, A: Ausgangsprobe, D: Durchlauf, E1: Elution (Peak 1), E2: Elution (Peak 2) (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Die Abbildung 2.17 bestätigt den Erfolg der FPLC-Aufreinigung des hergestellten VEGF₁₆₅ über die Heparin-Affinitätssäule. Das VEGF konnte sowohl im ersten als auch im zweiten Elutionspeak detektiert werden. Im ersten Peak liegt es jedoch durch ein anderes Protein (ca. 17 kDa), welches scheinbar ebenfalls Wechselwirkungen mit Heparin eingeht, verunreinigt vor. VEGF liegt im zweiten Elutionspeak rein vor, jedoch in einer geringen Konzentration. Da der Durchlauf relativ viel VEGF enthält, könnten weitere Optimierungen die Bindung des VEGF an der Säule verbessern und damit die Ausbeute an reinem VEGF stark erhöhen. Eine Möglichkeit für die schlechte Bindung des VEGF an Heparin könnte in einer unzureichenden Faltung des Proteins liegen. In weiteren Studien sollten daher die optimalen Faltungsbedingungen für das hergestellte VEGF₁₆₅ ermittelt werden. Als Alternative zur Verdünnung ist auch die Anwendung von Dialyse zur Faltung des Proteins denkbar.

Affinitätsaufreinigung über S-Tag

Das S-Tag Thrombin *Purification Kit* von Merck ermöglicht eine Proteinaufreinigung unter Abspaltung des S-Tags, sofern eine *thrombin cleavage site* zwischen dem Zielprotein und dem Tag vorliegt. Das Zielprotein bindet über seinen Tag an S-Proteine, welche kovalent an Agarose-Beads immobilisiert sind. Anschließend kann nach mehreren Waschschr

Zugabe des Thrombins das Protein über die *cleavage site* vom Tag abgespalten und isoliert werden.

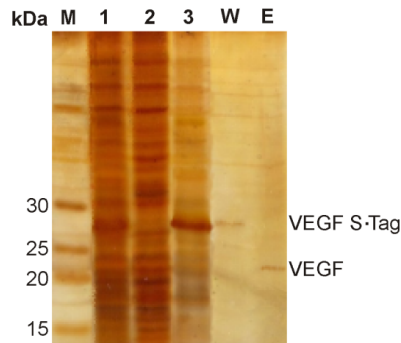


Abbildung 2.18 SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Fraktionen der Affinitätsaufreinigung über S-Tag. **M:** Proteinmarker, **1:** Unlösliche Fraktion nach Kultivierung, **2:** Lösliche Fraktion, **3:** Gelöste *Inclusion Bodies* nach Waschen, **W:** Waschfraktion, **E:** Elution (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Das SDS-Gel in Abbildung 2.18 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung. Durch mehrmaliges Waschen der *Inclusion Bodies* konnte im ersten Schritt schon eine deutliche Abreicherung der unerwünschten Proteine erzielt werden (Spur 3). Das VEGF wurde zu seiner vollständigen Lösung in 2 M Harnstofflösung aufgenommen und auf die S-Protein Agarose-Beads gegeben. Überschüssiges Protein wurde abgewaschen (Spur W). In der Elution (Spur E) ist eine schwache Bande auf Höhe des ungetaggtten VEGF zu erkennen. Trotz der recht hohen Ausgangskonzentration an Proteinlösung (ca. 1 mg/mL, NanoDrop ND-1000) liegt die Ausbeute an VEGF nur im Mikrogrammbereich. Möglicherweise ist ein Großteil des Proteins nicht von den Beads abgespalten worden oder es ist während des Aufreinigungsprozesses ausgefallen. Für eine Optimierung dieser Aufreinigungsstrategie und um höhere Ausbeuten an aufgereinigtem VEGF zu erhalten, muss zum einen getestet werden, ob die Aktivität von Thrombin in 2 M Harnstoff ausreichend ist, zum anderen ob VEGF längerfristig in 2 M Harnstofflösung gelöst bleibt.

Prinzipiell konnte mit allen drei getesteten Methoden eine Aufreinigung des produzierten VEGF_{S165} erzielt werden. Die besten Ergebnisse lieferte dabei die Heparinaffinitätschromatographie. Im Falle der Kationenaustauschchromatographie wurde nur sehr wenig VEGF eluiert. Durch eine Optimierung dieser beiden Aufreinigungsstrategien könnte die Aufreinigung noch verbessert werden. Zusätzlich wäre eine Kombination der beiden Methoden denkbar. Zunächst könnte VEGF mithilfe der Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Die vereinte Elutionsfraktion wird

einer Proteinfaltung unterzogen und anschließend über eine Heparin-Säule gereinigt. Eine weitere Optimierung des S-Tag Aufreinigungskits lohnt sich aus Kostengründen hingegen kaum.

In einem weiteren Ansatz könnte auch die Kultivierungsbedingungen verändert werden, um die Bildung von VEGF in der löslichen Fraktion zu induzieren und so die Faltungsproblematik des VEGF zu umgehen. Liegt das VEGF in kleineren Mengen in *E. coli* vor, so neigt es weniger zur Bildung von *Inclusion Bodies* [154]. Mit geringeren Wachstumsraten, bedingt durch die Kultivierungstemperatur und die Medienzusammensetzung, können niedrigere Expressionsraten erzielt und so die Bildung von Aggregaten minimiert werden.

2.3 Herstellung und Auswertung der Microarrays

In diesem Kapitel werden zunächst die verwendeten Methoden zur Herstellung und Auswertung der Aptamer-Microarrays erläutert und auf die Ergebnisse der experimentellen Überprüfung verschiedener Parameter der Aptamer-Microarrays eingegangen. Prinzipiell besteht ein Chip-Experiment aus vier wesentlichen Schritten:

- Immobilisierung (Spotting) der Fängermoleküle (*Forward-Phase* und Sandwich-Assay) bzw. des Analyten (*Reverse-Phase-Assay*) auf der Microarrayoberfläche
- Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Analyten bzw. Fängermolekülen
- Scannen des Microarrays
- Auswertung des Microarrays

Diese Schritte werden durch einen Blockierungsvorgang und mehrere Waschschritten zur Elimination unspezifisch gebundener Moleküle ergänzt. Für jeden verwendeten Aptamer-Assay wurden die optimalsten Bedingungen zur Herstellung und Inkubation der Microarrays ermittelt. Die anschließende Auswertung der Microarrays erfolgte für alle Experimente mit der Software GenePix Pro 6.0 (Axon, Forster City, CA, USA).

2.3.1 Einfluss der Spotting-Technologie

Zur Immobilisierung der Aptamere und Proteine auf den Microarrayslides wurden zwei verschiedene Spotter eingesetzt. Der Affymetrix 417 Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) arbeitet mit direktem Kontakt zur Oberfläche und der NanoPlotter NP 2.1 (GeSiM, Großerkmannsdorf, DE) kann mithilfe des piezoelektrischen Effekts ein minimales Volumen an Flüssigkeit ohne Kontakt zur Oberfläche in Form von einzelnen Spots abgeben.

Um die optimalen Spotting-Bedingungen für die Aptamer-Microarrays zu ermitteln, wurde die Abhängigkeit der Volumina der Spots und im Falle des NanoPlotters 2.1. auch die der Luftfeuchtigkeit während des Druckvorgangs von der Qualität der Spots (SNR: *Signal-to-Noise-Ratio*, Signal-zu-Rausch-Verhältnis) untersucht. Umso größer die SNR ist, desto höher ist die Qualität des betrachteten Spots. Die SNR stellt auch ein Maß für die Nachweisgrenze des Microarrays dar (siehe Abschnitt 2.3.4). Für die folgenden Untersuchungen wurde nur die Bindung des 6H7-Aptamers an die His-getaggte PFEI (*pseudomonas fluorescence esterase I*) im *Forward-Phase*- und *Reverse-Phase*-Format betrachtet.

2.3.1.1 Kontakt-Spotter

Der Affymetrix 417 Arrayer basiert auf dem Ring-und-Pin-System und überträgt pro Spot etwas 0,1 nL Flüssigkeit. Da dieser Spotter direkten Kontakt mit der Oberfläche benötigt, können nur feste, zweidimensionale Oberflächen wie z.B. Glasslides verwendet werden. Für *Forward-Phase*-Assays wurden die Slides mit jeweils fünf Hits pro Spot, also etwa 0,5 nL bedruckt und für *Reverse-Phase*-Assays mit acht Hits pro Spot, was einem Volumen von ca. 1 nL in einem Spot entspricht. Höhere Spot-Volumina führten zu keiner Verbesserung der SNR (Daten nicht gezeigt). Um eine gewisse Reproduzierbarkeit und eine direkte Vergleichbarkeit der Spots untereinander zu erreichen, wurde das Spotting in allen Experimenten mit demselben Pin durchgeführt.

2.3.1.2 Kontaktfreier Spotter

Der große Vorteil des kontaktfreien NanoPlotters NP 2.1 liegt vor allem in der hohen Reproduzierbarkeit der Tropfengrößen und der Wahl eines beliebigen Spotting-Musters auf dem Microarray. Mit diesem Verfahren können neben Glassubstraten auch poröse Materialien

wie Nitrocelluloseslides bedruckt werden. Laut Herstellerangaben gibt der NanoPlotter (mit NanoTip) pro Tropfen ca. 0,3 bis 0,4 nL ab, wobei diese Angaben mit den verwendeten Spottereinstellungen (u.a. Volt, Frequenz) und der zu spottenden Flüssigkeit variieren. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der SNR und Signalintensität wurden im *Forward-Phase*-Format mit drei Tropfen pro Spot und im *Reverse-Phase*-Format mit acht Tropfen erzielt (Daten nicht gezeigt).

Im *Reverse-Phase*-Format konnte durch eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit auf 60% eine deutliche Steigerung der SNR-Werte erzielt werden, wohingegen die Luftfeuchtigkeit nur geringe Auswirkungen auf die Immobilisierung der Aptamere im *Forward-Phase*-Format aufweist. Abbildung 2.19 zeigt die Steigerung der SNR in Prozent durch Einsatz von 60% Luftfeuchtigkeit während des Spotting in beiden Microarray-Formaten.

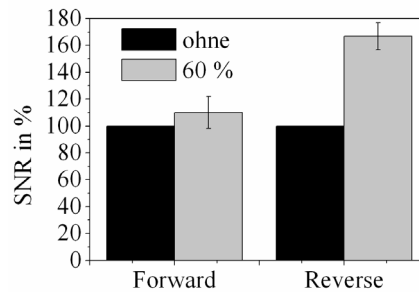


Abbildung 2.19 Einfluss der Luftfeuchtigkeit (60%) während des Spotting auf die SNR-Werte im *Forward*- (PEI-Aldehydslides) und *Reverse-Phase*-Format (Nitrocelluloseslides).

Im Schnitt konnte die SNR im *Forward-Phase*-Format um knapp 10% und im *Reverse-Phase*-Format um ca. 70% gesteigert werden. Die Luftfeuchtigkeit bewirkt ein langsames Eintrocknen der Spots, was zu einer gesteigerten Bindungseffizienz und hohen Homogenität der Spots führt [155, 156]. Dies scheint in erster Linie für die Immobilisierung von Proteinen, also im *Reverse-Phase*-Format, von Vorteil zu sein.

In allen weiteren Versuchen wurde im *Forward-Phase*-Format mit drei Tropfen pro Spot und im *Reverse-Phase*-Format mit acht Tropfen pro Spot und 60% Luftfeuchtigkeit gearbeitet.

Zusammengefasst gesehen ist die Wahl des Spotters vom jeweiligen Microarray und dem Format abhängig. Da die aptamerbasierten *Forward-Phase*-Microarrays auf Glassubstraten durchgeführt wurden, liefert der robuste Kontaktpotter gute Ergebnisse hinsichtlich der Immobilisierung der Aptamere. Durch die Verwendung des kontaktfreien Spotters konnte durch Einsatz von 60% Luftfeuchtigkeit während des Spottens, die SNR gesteigert werden.

Die Verwendung des kontaktfreien Spotters zur Immobilisierung von Proteinen auf Nitrocelluloseslides für *Reverse-Phase-Assays* ist aufgrund der Porösität der dreidimensionalen Membran zwingend notwendig. Durch erhöhte Luftfeuchtigkeit während des Immobilisierungsvorgangs konnte hier die SNR deutlich gesteigert werden.

2.3.2 Scannen der Microarrays

Das Scannen der Microarrays wurde mit dem GenePix 4000B (Axon, Forster City, CA, USA) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Zwei-Kanal-Fluoreszenzscanner, welcher ein digitales Abbild des Microarrays erzeugt. Um sowohl starke als auch schwache Signale erfassen zu können, werden die Microarrays bei verschiedenen Photomultipliersensitivitäten (*PMT-Gain*) und Laserstärken (33% oder 100%) vermessen. Bei Verwendung von Nitrocellulose wurde nur mit einer Laserstärke von 33% gescannt, um eine Beschädigung der Membran durch den Laser zu umgehen.

2.3.3 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff

Zur Detektion der Spots wurden die Proteine (*Forward-Phase*) bzw. die Aptamere (*Reverse-Phase* und Sandwich) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Indocarbocyanin) modifiziert. Das Anregungsmaximum dieses Farbstoffs liegt bei 550 nm und er emittiert maximal bei 570 nm.

2.3.4 Auswertung der Microarrays

Die Auswertung der Spots erfolgte mit der Software GenePix Pro 6.0. Auf das digitale Abbild des Chips wird eine Maske, ein so genanntes *Grid*, gelegt, welche das Spotting-Muster des Microarrays beinhaltet. Nachdem die Maske exakt auf die Spots angepasst wurde, erfolgt die Auswertung. Hierbei ermittelt das Programm für jeden Spot eine Vielzahl verschiedenster Parameter, wie Signalintensität, Hintergrundintensität, Spotdurchmesser und SNR.

In dieser Arbeit wurden in erster Linie die Signalintensität (SM: *Signal Mean*), die Intensität des Hintergrunds (BM: *Background Mean*), die relative Signalintensität (SM - BM) und die *Signal-to-Noise-Ratio* (SNR) zur Auswertung herangezogen. Aber auch andere Angaben wie z.B. der Spotdurchmesser liefern wertvolle Informationen über die entwickelten Aptamer-

Microarrays. Die SM stellt die Intensität des Spots, gemittelt über alle Pixel innerhalb des Spots, dar. Die relative Signalintensität hingegen liefert Informationen über die Signalintensität des Spots abzüglich der Hintergrundintensität. Die SNR gibt das Verhältnis der relativen Signalintensität zur Standardabweichung des Hintergrunds (*Stdev.BG*) an und wurde nach Formel 3.1 bestimmt. Die SNR kann als Maß für die Signalqualität heran gezogen werden. Umso höher die SNR desto höher ist die Qualität des Spots.

$$SNR = \frac{SM-BM}{Stdev.BG} \quad [\text{Formel 3.1}]$$

Das Detektionslimit (LOD, *Limit of Detection*) eines Microarrays wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, welche noch zu einer SNR von ≥ 3 führt [157]. Da die SNR auch von dem verwendeten PMT-Gain abhängt, wurden zur Ermittlung der maximalen SNR (SNR_{\max}) eines Experiments stets verschiedene Scans desselben Slides zur Auswertung herangezogen.

Jeder Spot wurde jeweils mit neun Replikaten auf die Microarrays gespottet. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Microarrays wurden nur Scans mit gleichem PMT-Gain sowie der gleichen Laserstärke herangezogen.

2.4. Entwicklung und Optimierung der Aptamer-Microarrays

Dieses Kapitel präsentiert die Entwicklung der entwickelten Aptamer-Microarrays. Es ist unterteilt in die Detektion His-getagter Proteine (siehe Abschnitt 2.4.1, Seite 66), Immunoglobuline (siehe Abschnitt 2.4.2, Seite 91) und VEGF₁₆₅ (siehe Abschnitt 2.4.3, Seite 109). Die Aptamere gegen His-Tag dienen aufgrund der leichten Verfügbarkeit der Proteine in erster Linie als Modellsystem zur Entwicklung und Testung verschiedener Oberflächen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die entsprechenden Assays für die Detektion verschiedener Immunoglobuline und VEGF₁₆₅ aufgebaut.

2.4.1 Detektion His-getaggtter Proteine

Zunächst wird der *Forward-Phase*-Assay vorgestellt. Hierbei konnte die Detektion der drei His-getaggtten Proteine PFEI, Bgl und GFP auf modifizierten Aldehyd- sowie EpoxySlides realisiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zusätzlich verschiedenen funktionalisierte Microarrays und molekulare Oberflächenspacer hinsichtlich der Funktionalität der Aptamere gegen den His-Tag im *Forward-Phase*-Format getestet.

Der zweite Abschnitt zeigt die Entwicklung und Optimierung des *Reverse-Phase*-Assays auf Nitrocellulose- und Aldehydslides. Dieser Assay ermöglichte die schnelle Analyse einer Vielzahl an Proben in einem Experiment.

Die optimierten Protokolle zur Detektion His-getaggtter Proteine mit aptamerbasierten Microarrays sind im Anhang (Seite 152) zu finden.

2.4.1.1 *Forward-Phase*-Assay

Ein wesentlicher Schritt der Entwicklung eines Aptamer *Forward-Phase*-Assays ist der Erhalt der Funktionalität der Aptamere auch nach der Immobilisierung auf der Microarrayoberfläche. Die Funktionalität ist hier definiert als die Fähigkeit der Aptamere, ihr Targetprotein zu erkennen und spezifisch zu binden. Wichtig ist dabei in erster Linie die Gewährleistung der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der immobilisierten Aptamere. Nur in der „richtigen“ Konformation kann die Bindung des Targetmoleküls und somit eine Detektion erfolgen. Die korrekte Faltung der Aptamere kann zum einen durch sterische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche, aber auch durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinträchtigt werden.

Der Nachweis der His-getaggtten Proteine gelang auf Polyethylenimin(PEI)-modifizierten Aldehydslides, kommerziell erhältlichen Epoxy-Polyethylenglykol(PEG)-Slides und auf Glasobjektträgern, welche mit verschiedenen funktionellen Gruppen modifiziert wurden. Das Aptamer 6H5 zeigte bei allen verwendeten Oberflächen geringere Signalintensitäten und SNR-Werte als das Aptamer 6H7. Da das 6H5 Aptamer somit eine geringe Bindungsaffinität auf Microarray-Oberflächen aufweist, sind im Folgenden nur die Ergebnisse des Aptamers 6H7 gezeigt. Das Aptamer wurde mit dem Kontakt-Spotter jeweils in vier verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 150 und 200 μM in PBS-6H7) gespottet. Der Nachweis der

Funktionalität wurde mit His-getaggen Cy3-markierten Proteinen in einer Konzentration von 1 µg/mL durchgeführt.

Detektion auf PEI-Aldehydslides

Basierend auf einer optimierten Immobilisierungsstrategie von Walter *et al.* (2008) [9] wurden die Aptamere über einen Cyanurchlorid-Linker an Polyethylenimin (PEI)-modifizierte Aldehydslides immobilisiert. Die Modifizierung der Microarray-Oberfläche mit PEI erfolgt unter der Ausbildung Schiff'scher Basen und bewirkt zum einen eine erhöhte Bindungskapazität und PEI liefert als molekularer Spacer ausreichend großen Abstand zur Oberfläche. Die Bindung des Aptamers an PEI erfolgt über einen terminalen Aminolinker, welcher mit Cyanurchlorid aktiviert ist (Abbildung 2.20). Die möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen des Aptamers mit den Aminogruppen der Oberfläche werden durch eine anschließende Umpolung mit Bernsteinsäureanhydrid minimiert. Um eine optimale Faltung der immobilisierten Aptamere zu erreichen, beinhaltet das Protokoll vor der Inkubation mit dem Zielprotein einen Denaturierungsschritt. Hierbei werden die Slides nach dem Blockieren mit BSA mit siedendem Reinstwasser übergossen um eine Entfaltung der Aptamere zu erzielen. Durch anschließende Inkubation der Slides im SELEX-Puffer PBST-6H7 werden die Aptamere korrekt gefaltet.

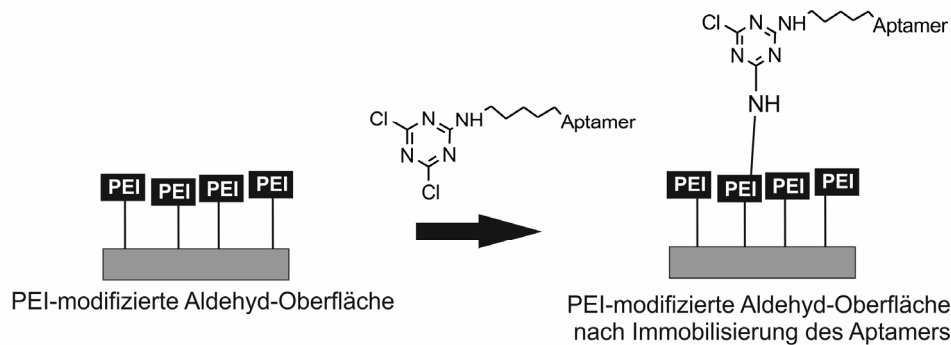


Abbildung 2.20 Bindung des Aptamers über einen Cyanurchloridlinker an die PEI-modifizierte Aldehyd-Oberfläche.

Für PFEI-his konnte mit diesem System eine Nachweisgrenze von 3,3 nM erzielt werden [137]. Desweiteren wurde für die Aptamere 6H7 und 6H5 gezeigt, dass die Immobilisierung über das 5'-Ende in einer höheren Funktionalität des Aptamers resultierte. Somit ist vermutlich das 3'-Ende des Oligonukleotidstrangs maßgeblich an der Targetbindung beteiligt.

Um einerseits den bestehenden Aptamer-Assay zu vereinfachen, aber auch um niedrigere Nachweisgrenzen zu erzielen wurden weitere Oberflächen zur Detektion His-getaggtter Proteine im *Forward-Phase*-Format getestet.

Detektion auf Epoxy-PEG-Slides

Um eine Vereinfachung des Protokolls zu erreichen, wurden epoxylierte Microarrays zur Detektion von His-getaggtten Proteinen getestet. Diese kommerziell erhältlichen Oberflächen (Scienion AG) sind mit Polyethylenglykol als molekularer Spacer modifiziert. Das Aptamer muss in diesem Fall nicht aktiviert werden, sondern kann direkt über den C₆-Aminolinker immobilisiert werden (Abbildung 2.20). Ebenso ist eine Umpolung der negativ polarisierten Oberfläche überflüssig. Ansonsten wurde das Protokoll von Walter *et al.* (2008) inklusive des Denaturierungsschritts übernommen.

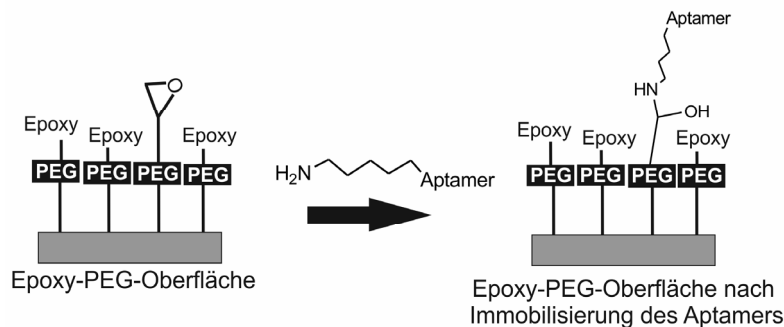


Abbildung 2.21 Bindung des Aptamers an die Epoxy-PEG-Oberflächen über den C₆-Aminolinker.

Zum direkten Vergleich der beiden Oberflächen wurde ein *Forward-Phase*-Assay zur Detektion von PFEI-his auf den Epoxy-PEG- und PEI-Aldehyd-Oberflächen parallel durchgeführt. Das Aptamer 6H7 wurde in beiden Fällen mit dem Kontakt-Spotter über das 5'-Ende immobilisiert. Die Abbildung 2.22 zeigt die Scans und die Signalintensitäten sowie SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Aptamers. Mit den Epoxy-PEG-Oberflächen konnten weitaus höhere Signalintensitäten erzielt werden als mit den PEI-Aldehydslides. Jedoch ist der Hintergrund unregelmäßiger und liefert ein höheres Signal. Somit sind die SNR-Werte der Epoxy-PEG-Slides zwar etwas höher, liegen aber in einem ähnlichen Bereich wie bei den PEI-Aldehydslides.

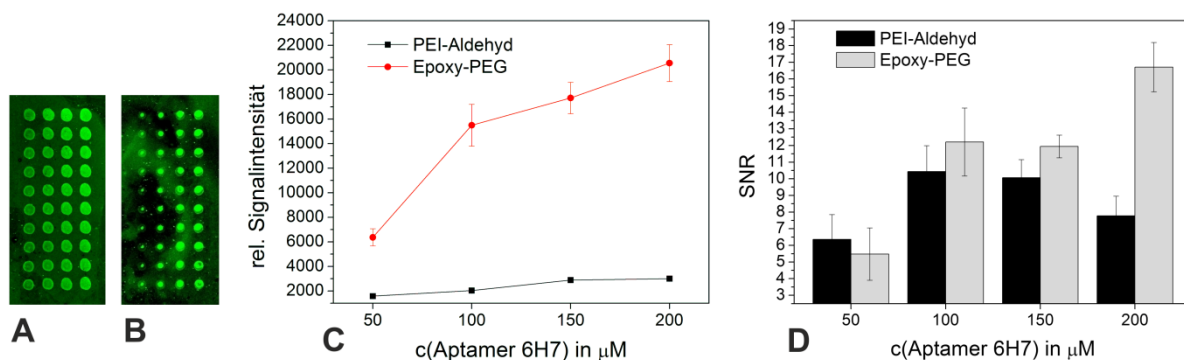


Abbildung 2.22 Vergleich der PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Oberflächen im *Forward-Phase*-Format. Scan des (A) PEI-Aldehyd- und (B) Epoxy-PEG-Microarrays nach Inkubation mit Cy3-markierter PFEI-his. Die Diagramme zeigen die relativen Signalintensitäten (C) und die SNR-Werte (D) für die Bindung von PFEI-Cy3 in Abhängigkeit von der Konzentration an immobilisiertem Aptamer 6H7 für die beiden Oberflächen im Vergleich (PMT-Gain: 600).

Die Nachweisgrenze für PFEI-his lag mit diesen Oberflächen bei 5 nM. Mit den Aldehyd-PEI-Oberflächen konnte hingegen eine LOD von 3,3 nM für die Detektion von His-getaggtter PFEI im *Forward-Phase*-Format erzielt werden [137]. Somit sind die Epoxy-PEG-Slides insgesamt etwas schlechter geeignet als die PEI-Aldehydslides.

Ein Grund für die viel höhere Signalintensität der Epoxy-PEG-Slides könnte einerseits in einer erhöhten Funktionalität der Aptamere oder in einer höheren Immobilisierungsdichte der Aptamere auf der Oberfläche liegen. Um die Immobilisierungseffizienz der beiden Oberflächen direkt vergleichen zu können, wurde 3'-Cy3-markiertes Aptamer 6H7 auf Epoxy-PEG-Slides und 3'-Cy3-markiertes 6H7, aktiviert mit Cyanurchlorid, auf PEI-Aldehydslides gespottet. Nach mehrmaligem Waschen wurden die erhaltenen relativen Signalintensitäten der Microarrays gegenüber gestellt. Die Signalintensitäten in Abbildung 2.23 zeigen, dass die Immobilisierungseffizienz für beide Oberflächen nahezu identisch ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass ungefähr gleich viele Aptamermoleküle auf den Slides immobilisiert werden. Die Ergebnisse bestätigen eine höhere Funktionalität des Aptamers auf Epoxy-PEG-Slides. Dies kann vermutlich auf besseren sterischen Bedingungen hinsichtlich der Länge bzw. des Verzweigungsgrades des molekularen Spacers zurückgeführt werden.

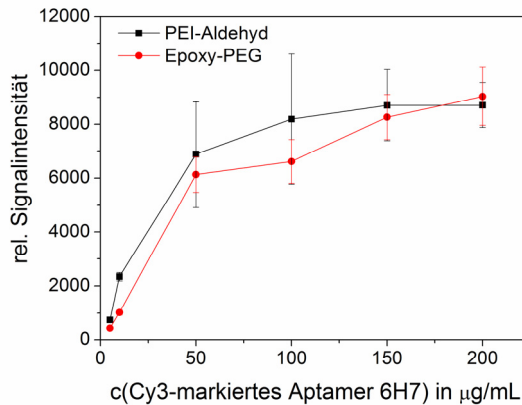


Abbildung 2.23 Vergleich der Immobilisierungseffizienz der PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Oberflächen. Gezeigt sind die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Cy3-markierten Aptamers 6H7 (PMT-Gain: 500).

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Aptamerfunktionalität von der Länge des molekularen Spacers auf der Microarrayoberfläche wurde die Detektion von PFEI-Cy3 mit dem Aptamer 6H7 auf Oberflächen mit molekularen Spacern unterschiedlicher Länge wiederholt. Es wurden Epoxyslides ohne Spacer, Epoxy-PEG540- und Epoxy-PEG640-Oberflächen verwendet. Das PEG540 unterscheidet sich von PEG640 in einer um 100 g/mol verminderten durchschnittlichen Molekülmasse (PEG540: 540 g/mol, PEG640: 640 g/mol). Diese geringere Molekülmasse hat letztendlich auch den Effekt einer verminderten Länge und eines kleineren Verzweigungsgrads des Spacers.

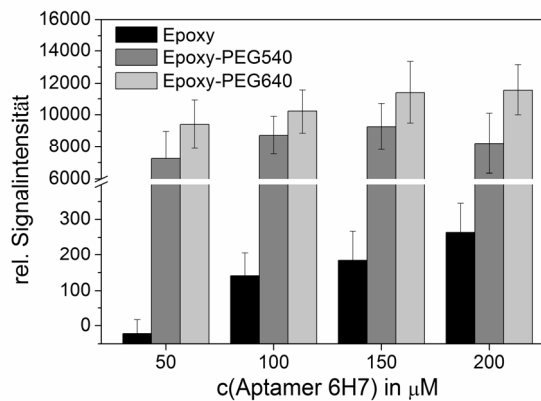


Abbildung 2.24 Abhängigkeit der Aptamerfunktionalität von der Länge des molekularen Spacers zwischen Aptamer und Oberfläche im *Forward-Phase-Format*. Gezeigt sind die relativen Signalintensitäten für die Bindung von PFEI-Cy3 in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Aptamers 6H7 auf Epoxy-, PEG540-Epoxy- und PEG640-Epoxyslides (PMT-gain: 500).

Die Ergebnisse in Abbildung 2.24 bestätigen die Notwendigkeit eines molekularen Spacer auf der Microarray-Oberfläche. Für die Oberflächen ohne Spacer wurde ein sehr geringes Signal

erhalten. Das Aptamer kann auf einfachen EpoxySlides vermutlich nicht die „richtige“ dreidimensionale Form zur Bindung des Targetproteins PFEI-his annehmen. Die Funktionalität des Aptamers und somit die Bindung der PFEI-his ist auf beiden PEG-Oberflächen gewährleistet, wobei die Verwendung der Oberfläche mit dem höher molekularem PEG zu noch höheren Signalintensitäten führt. Für die hier verwendeten Oberflächen gilt, dass die Funktionalität des immobilisierten Aptamers mit der Länge und des Verzweigungsgrades zunimmt.

Desweiteren wurde die Epoxy-PEG640-Oberfläche auf ihre Anwendbarkeit hinsichtlich der Detektion anderer His-getaggtten Proteine untersucht. Hierfür wurden die Microarrays mit Cy3-markiertem Bgl-his und GFP-his inkubiert und die Ergebnisse mit der Detektion der PFEI-his verglichen.

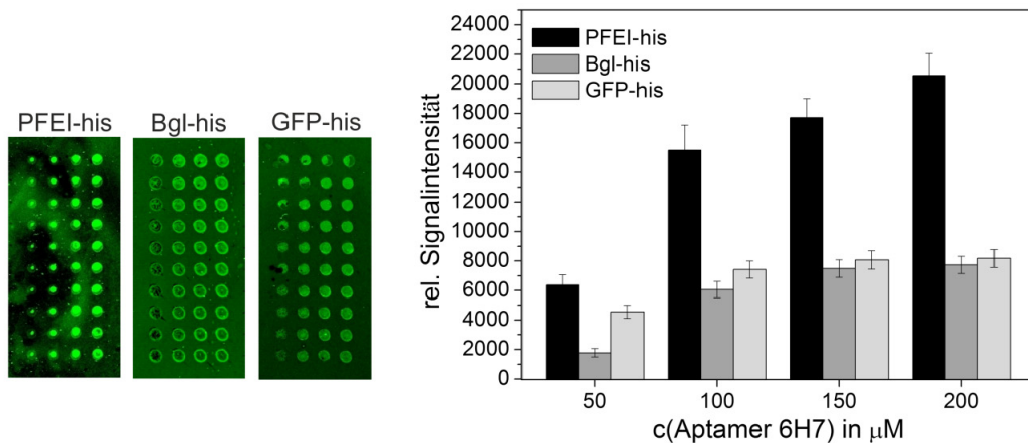


Abbildung 2.25 Vergleich der relativen Signalintensitäten der Detektion von Cy3-markierter PFEI-, Bgl- und GFP-his in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Aptamers 6H7 auf Epoxy-PEG640-Oberflächen im *Forward-Phase*-Format (PMT-Gain: 600).

Die Abbildung 2.25 zeigt die erhaltenen relativen Signalintensitäten. Generell ist die Detektion weiterer His-getaggtter Proteine möglich, im Falle des Bgl und GFP wurden jedoch deutlich niedrigere Signalintensitäten als für PFEI erzielt. Bgl und GFP werden in ähnlicher Quantität auf dem Microarray gebunden. Da die D/P-Ratio für alle drei Proteine ähnlich war, (0,7-0,8) ist davon auszugehen, dass die Zugänglichkeit des His-Tags bei den Proteinen unterschiedlich ist. Die Faltung des Proteins kann zur Folge haben, dass der Histidin-Tag für das Aptamer schlecht zugänglich ist. Neben sterischen Effekten hinsichtlich der Zugänglichkeit des His-Tags, kann auch die Ladungsverteilung in der direkten Umgebung des

His-Tags eine Rolle spielen. Ist diese negativ polarisiert, so führt es zu einer Abstoßung des negativ geladenen Aptamers.

Screening verschiedener Oberflächen und Spacer

Um den Einfluss der Oberflächenmodifikation sowie der Länge des molekularen Spacer im *Forward-Phase-Format* näher zu charakterisieren, wurde ein umfangreiches Screening verschiedenster Oberflächen und Spacer durchgeführt¹³. Ausgehend von unmodifizierten Glasobjektträgern wurden durch chemische Synthese komplexe Microarrays zur Immobilisierung von Aptamern hergestellt.

Der erste Schritt ist die Silanisierung der Glasoberflächen (Abbildung 2.26). Ausgehend von der epoxy-modifizierten Oberfläche (Abbildung 2.26 B) können durch Behandlung mit Salzsäure und Natriumperiodat Aldehydgruppen (Abbildung 2.26 C) generiert werden.

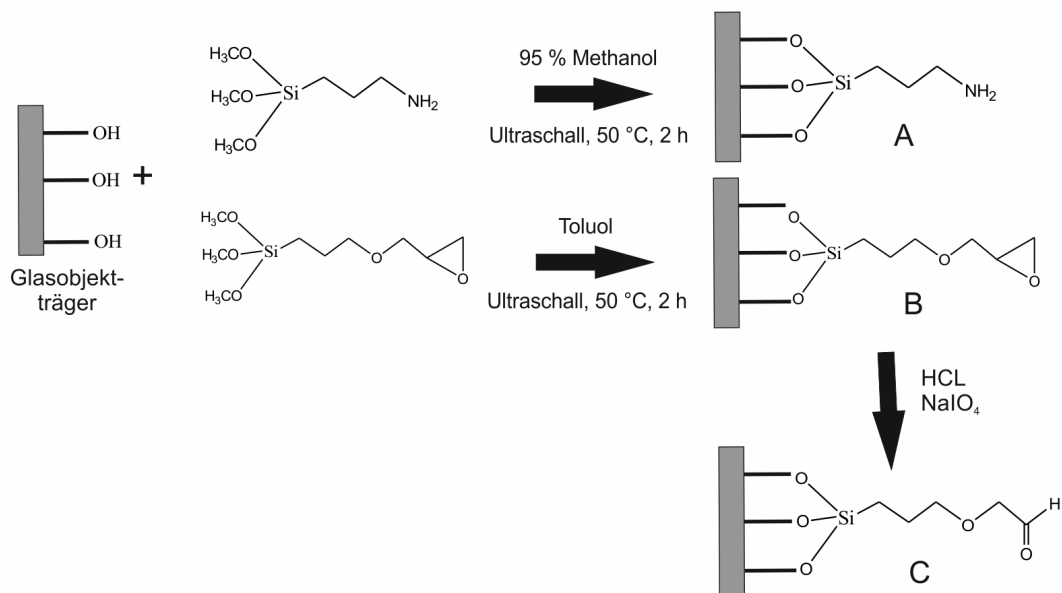


Abbildung 2.26 Chemische Reaktionen zur Herstellung von (A) amino-, (B) epoxy- und (C) aldehydfunktionalisierten Oberflächen ausgehend von Glasobjektträgern.

Diese drei funktionellen Gruppen, Amino, Epoxy und Aldehyd, wurden zur Immobilisierung der Aptamere verwendet. Während die Aptamere an Epoxy- und Aldehydgruppen direkt über einen C₆-Aminolinker binden können, mussten zur Kopplung an aminomodifizierte Oberflächen entweder das Aptamer aktiviert werden (Cyanurchlorid, siehe Abschnitt 2.4.1.1) oder die Oberfläche. Für diese Studie wurde eine Aktivierung der Aminooberflächen nach

¹³ Masterarbeit Guohong Zhu

Balamurugan *et al.* (2008) [122] mit 1,4-Phenylendiisocyanat (PDIC) durchgeführt (Abbildung 2.27). Dies gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da in allen Experimenten die gleichen Aptamere immobilisiert werden. Die Bindung des Aptamers erfolgt anschließend über den Aminolinker (siehe Abschnitt 1.2.2.2, Abbildung 1.10). Der Bindungserfolg des Aptamers 6H7 auf den hergestellten Oberflächen wurde mittels SYBR-Green-Färbung überprüft. SYBR Green I und II sind Cyanin-Farbstoffe, welche in DNA interkalieren. Dieser DNA-Komplex kann anschließend mithilfe des Fluoreszenzscanners sichtbar gemacht werden. Die Bindungserfolg der Aptamere konnte auf allen hergestellten Oberflächen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

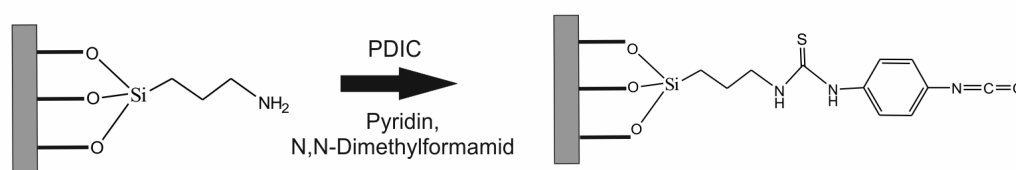


Abbildung 2.27 Aktivierung von aminomodifizierten Oberflächen mit 1,4-Phenylendiisocyanat (PDIC).

Basierend auf diesen Oberflächen wurden verschiedene molekulare Spacer an die Oberfläche über den Linker Acryloylchlorid gekoppelt. Dabei handelte es sich um lineare und verzweigte Spacer mit den jeweiligen terminalen funktionellen Gruppen. Die Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht über die hergestellten und getesteten aminofunktionalisierten Oberflächen mit verschiedenen molekularen Spacern. Die entsprechenden epoxy- und aldehydmodifizierten Oberflächen wurden jeweils ausgehend von den Oberflächen in Tabelle 2.4 durch Reaktion mit 1,2,7,8-Diepoxyoctan (DEO) bzw. Glutaraldehyd generiert (Abbildung 2.28).

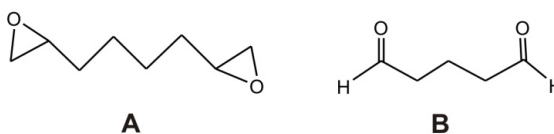
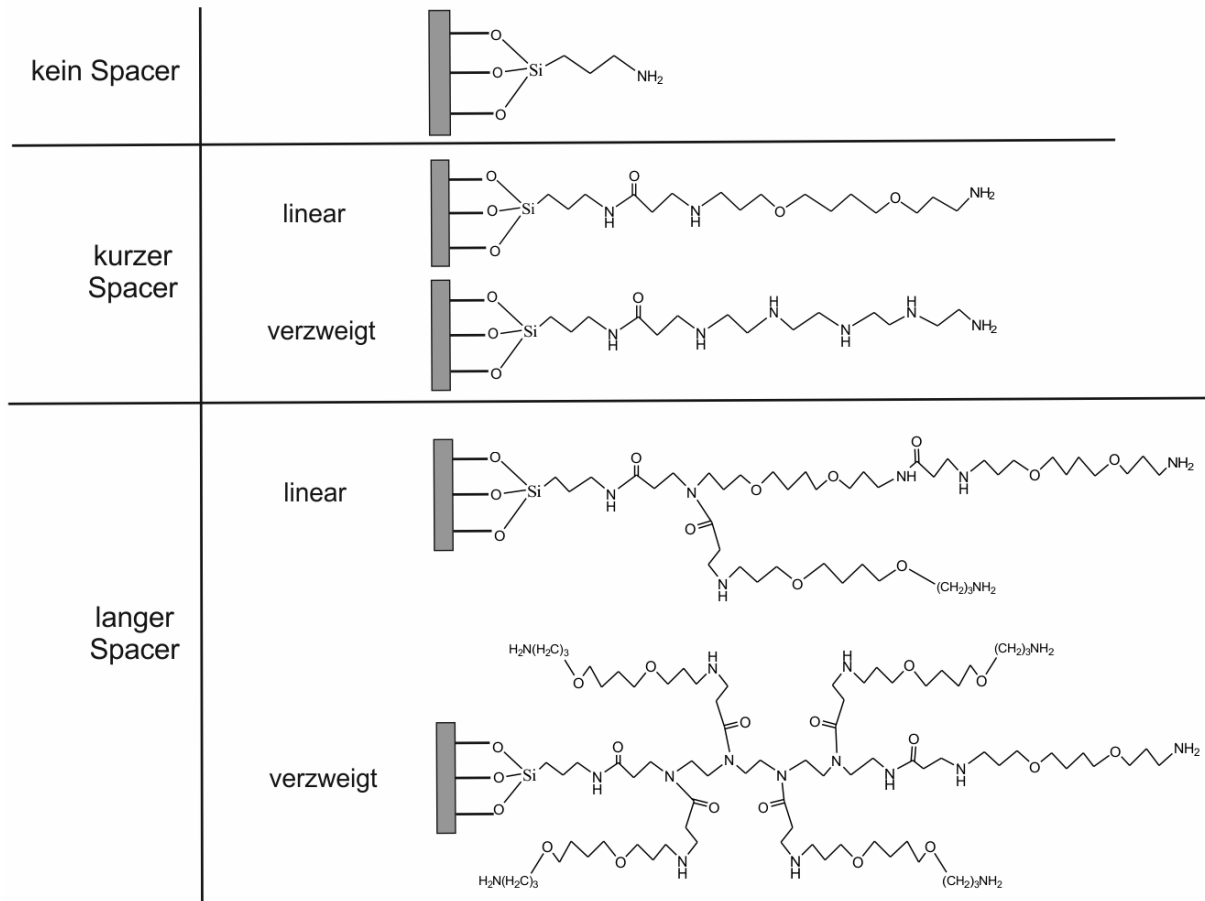


Abbildung 2.28 Strukturformeln von 1,2,7,8-Diepoxyoctan (A) und Glutaraldehyd (B).

Um die optimale Struktur und Länge der molekularen Spacer auf der Oberfläche für die Aptamerfaltung zu definieren, wurden fünf verschiedene Microarray-Oberflächen hergestellt: „kein Spacer“, „kurz-verzweigt“, „kurz-linear“, „lang-verzweigt“ und „lang-linear“. Diese Oberflächen wurden jeweils mit amino-, aldehyd- oder epoxyfunktionalisierten terminalen Gruppen modifiziert. Der lineare kurze Spacer hat nur eine Aptamerbindungsstelle an

terminaler Position, wohingegen der verzweigte Spacer eine höhere Dichte an funktionellen Gruppen aufweist.

Tabelle 2.4 Übersicht über die konstruierten aminofunktionalisierten Microarrays mit verschiedenen molekularen Spacer.



Im Folgenden werden die Ergebnisse für die amino-, epoxy- und aldehydmodifizierten Oberflächen präsentiert und diskutiert. Zur Überprüfung der Funktionalität der immobilisierten Aptamere wurde das Aptamer 6H7 auf den Oberflächen immobilisiert und mit PFEI-Cy3 inkubiert. Sowohl die Signalintensität als auch die SNR wurden zur Auswertung und zum Vergleich der Oberflächen herangezogen. Die gezeigten Daten basieren auf einer Konzentration des zu immobilisierenden Aptamers 6H7 von 200 μM .

Aminofunktionalisierte Oberflächen

Die Bindung der PFEI-his an die immobilisierten Aptamere erfolgte in unterschiedlicher Quantität auf den verschiedenen Oberflächen. Die Abbildung 2.29 stellt die erhaltene Signalintensität und SNR in Abhängigkeit von der Oberfläche dar.

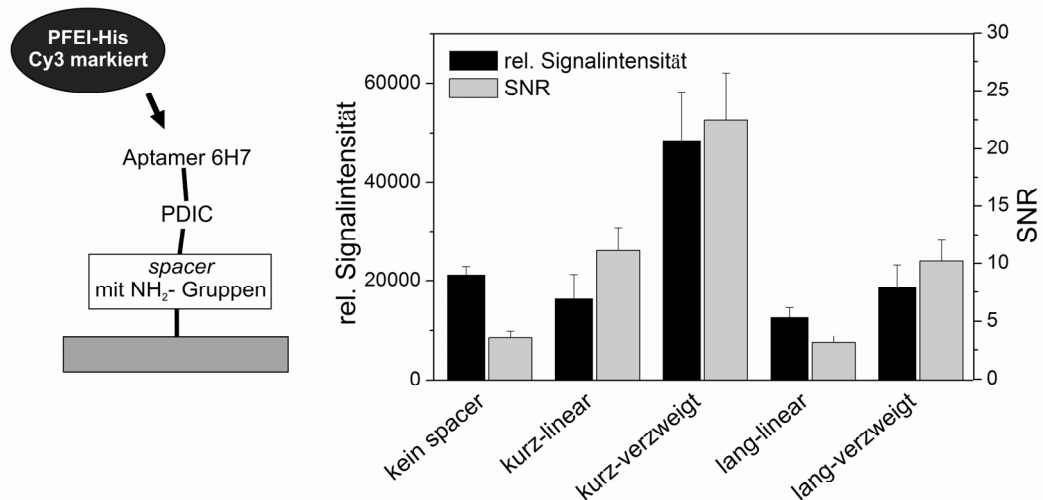


Abbildung 2.29 Relative Signalintensitäten und SNR-Werte der Aptamer-Microarrays für die Detektion von Cy3-markierter PFEI-his auf aminofunktionalisierten Oberflächen mit verschiedenen molekularen Spacern im *Forward-Phase*-Format (PMT-Gain: 600).

Die besten Ergebnisse konnten auf der Oberfläche mit kurzem, verzweigtem Spacer erzielt werden. Die Oberfläche mit langem, verzweigtem Spacer lieferte eine geringere Bindungseffizienz des Targetproteins. Eventuell neigen langkettige Moleküle zu einer intramolekularen Faltung und behindern so die Immobilisierung sowie die Funktionalität des Aptamers. Alle Oberflächen werden zur Bindung des Aptamers in einem ersten Schritt mit PDIC aktiviert. Möglicherweise kann diese Modifizierung im Falle des langen, verzweigten Spacers aufgrund sterischer und elektrostatischer Hinderungen nicht mit ausreichender Effizienz erfolgen. Auf den Oberflächen mit den linearen Spacer ist die Immobilisierungseffizienz des Aptamers wegen der vergleichsweise geringen Anzahl an freien Bindungsstellen vermutlich zu gering.

Epoxyfunktionalisierte Oberflächen

Die Abbildung 2.30 zeigt die relativen Signalintensitäten und SNR-Werte in Abhängigkeit von den verwendeten molekularen Spacern auf epoxyfunktionalisierten Oberflächen. Insbesondere auf den Oberflächen mit „lang-linearem“ und „kurz-verzweigtem“ Spacer hat das Aptamer 6H7 eine geringe Funktionalität. Die Verwendung des Spacer „lang-verzweigt“ resultiert hingegen in den besten Ergebnissen hinsichtlich der Detektion von PFEI-his. Sowohl die SNR als auch die Signalintensität sind mehr als doppelt so groß als bei den anderen Oberflächen. In diesem Fall scheint sowohl die Länge des Spacers als auch der Verzweigungsgrad sich positiv auf die Funktionalität des Aptamers auszuwirken.

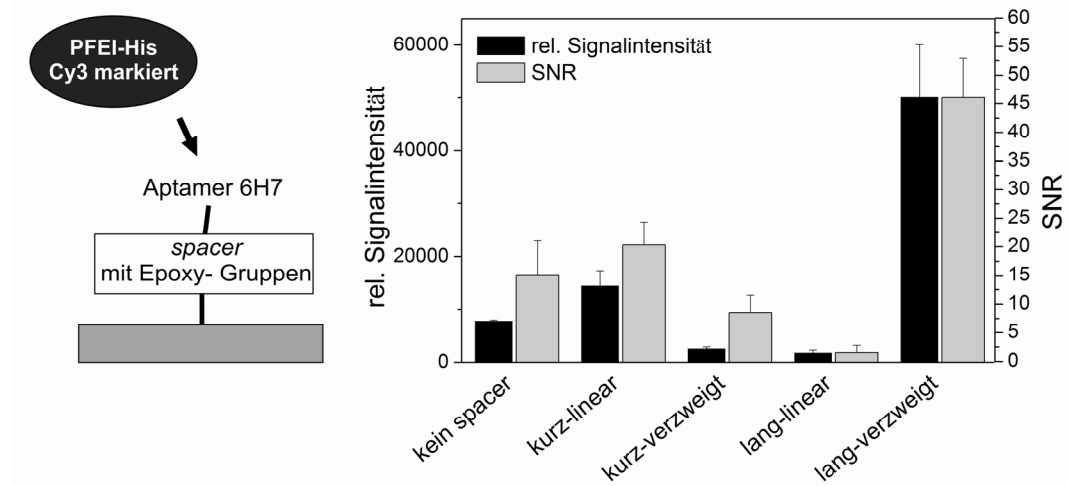


Abbildung 2.30 Relative Signalintensitäten und SNR-Werte der Aptamer-Microarrays für die Detektion von Cy3-markierter PFEI-his auf epoxyfunktionalisierten Oberflächen mit verschiedenen molekularen Spacern im *Forward-Phase-Format* (PMT-Gain: 600).

Aldehydfunktionalisierte Oberflächen

Bei den aldehydfunktionalisierten Oberflächen hat die Verwendung unterschiedlicher Spacer einen geringeren Einfluss auf die Signalintensitäten und SNR-Werte als bei den amino- und aldehydfunktionalisierten Microarrays (Abbildung 2.31). Insgesamt gesehen zeigt hier aber auch der Spacer „lang-verzweigt“ die höchsten Werte. Die anderen Spacer unterscheiden sich kaum untereinander. Die Verwendung eines Spacers ist hier also nur ab einer bestimmten Länge sinnvoll. Bei kleineren Längen des molekularen Spacers ist der Effekt der Verbesserung der Funktionalität nicht zu beobachten.

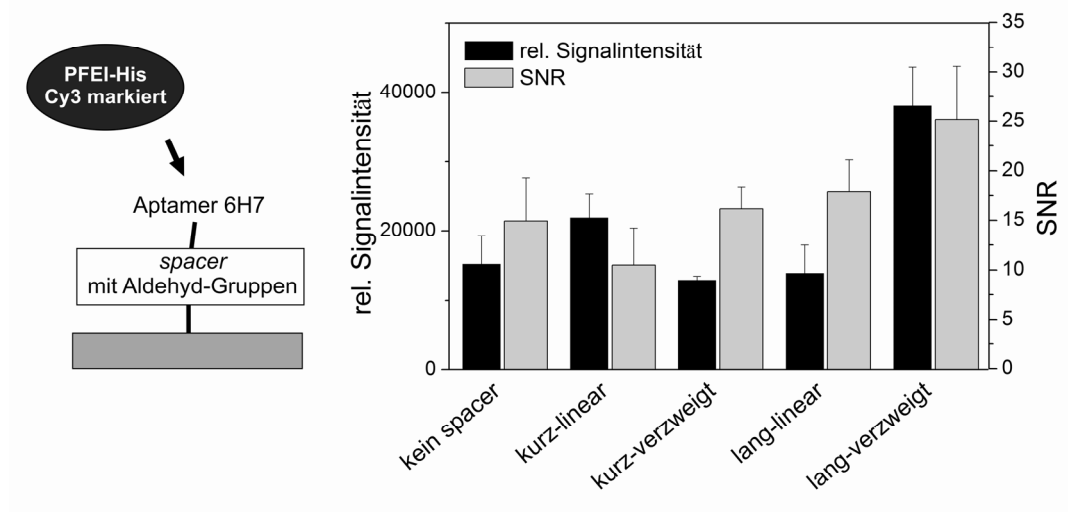


Abbildung 2.31 Relative Signalintensitäten und SNR-Werte der Aptamer-Microarrays für die Detektion von Cy3-markierter PFEI-his auf aldehydfunktionalisierten Oberflächen mit verschiedenen molekularen Spacern im *Forward-Phase-Format* (PMT-Gain: 600).

Vergleich der Oberflächen

Generell hat sich die Verwendung eines verzweigten Spacers positiv auf die Bindung des Targetmoleküls und somit auf die Funktionalität des immobilisierten Aptamers ausgewirkt. Dies ist vermutlich auf die höhere Aptamerbindungskapazität der Microarrays zurückzuführen.

Zum Vergleich der verschiedenen getesteten Oberflächen wurden jeweils die Ergebnisse der Microarrays mit den besten Resultaten in Abbildung 2.32 zusammengestellt. Neben den selbst konstruierten Microarrays sind ebenfalls die PEI-Aldehydslides und die kommerziell erhältlichen Epoxy-PEG-Slides aufgeführt.

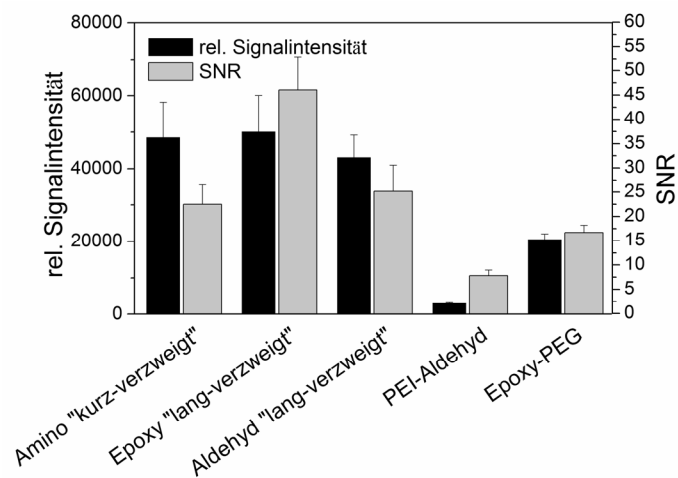


Abbildung 2.32 Vergleich der getesteten Oberflächen. Relative Signalintensitäten und SNR-Werte der Aptamer-Microarrays für die Detektion von Cy3-markierter PFEI-his auf verschiedenen Oberflächen im *Forward-Phase*-Format (PMT-Gain: 600).

Im Vergleich zu den konventionellen Aldehyd-PEI- und Epoxy-PEG-Slides konnte die Signalintensität und die SNR für die Detektion von PFEI-his mit den selbst konstruierten Oberflächen deutlich gesteigert werden. Die besten Ergebnisse erzielte die epoxyfunktionalisierte Oberflächen mit dem Spacer „lang-verzweigt“.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen erneut die Notwendigkeit eines molekularen Spacers zwischen Aptamer und Oberfläche für eine optimale Aptamerfaltung und Targetbindung. Neben der Länge spielt auch der Verzweigungsgrad eine wichtige Rolle hinsichtlich der Immobilisierungskapazität der Oberfläche. Durch die Konstruktion definierter Spacer mit verschiedenen Längen sowie Verzweigungsgraden auf Oberflächen ist es möglich, vielversprechende Microarray-Substrate für die aptamerbasierte Detektion von Proteinen im *Forward-Phase*-Format herzustellen, welche kommerziell nicht erhältlich sind.

Einfluss der Position des molekularen Spacers

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss eines am Aptamer integrierten molekularen Spacers auf die Targetbindung untersucht. Lao *et al.* (2009) zeigten bereits die Anwendbarkeit eines Kohlenstoff- bzw. Tymidin-Spacers am terminalen Ende eines Aptamers zur Detektion von Thrombin. Im Vergleich zu den Aptameren ohne molekularen Spacer konnte die Sensitivität des Assays bis zu 1000-fach gesteigert werden [10].

Das Aptamer 6H7 wurde am 5'-Ende mit zehn Thymidinen und Hexaethylenglykol (HEG) modifiziert und anschließend auf epoxy- und aldehydmodifizierte Slides ohne Spacer gespottet. Zur Kopplung an die Microarrays wies das Aptamer eine terminale Aminogruppe auf. In Abbildung 2.33 sind die relativen Signalintensitäten und SNR-Werte der Microarray-Eperimente unter Verwendung der Aptamers 6H7 mit und ohne integriertem 10T-HEG-Spacer dargestellt. Zum Vergleich sind ebenfalls die entsprechenden SNR-Werte bei Verwendung der spacermodifizierte Oberfläche „lang-verzweigt“ aufgetragen.

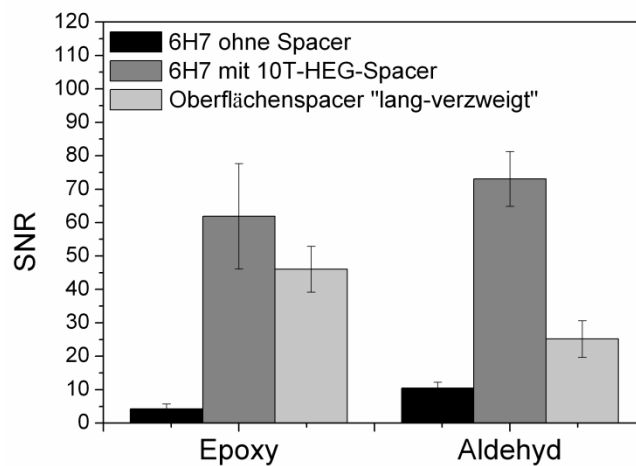


Abbildung 2.33 SNR-Werte der Aptamer-Microarrays für die Detektion von Cy3-markierter PFEI-his auf epoxy- und aldehydfunktionalisierten Oberflächen im *Forward-Phase*-Format. Vergleich von Aptamer 6H7 ohne Spacer, mit integriertem 10T-HEG-Spacer und Oberflächenspacer „lang-verzweigt“ (PMT-Gain: 600).

Die Ergebnisse bestätigen eine erhöhte Funktionalität des immobilisierten Aptamers 6H7 bei Verwendung des intramolekularen Spacers. Es konnte nicht nur im Vergleich zu dem unmodifizierten Aptamer die SNR eindeutig gesteigert werden. Auch im Vergleich zu den vorherigen Versuchen mit den spacermodifizierten Oberflächen konnte die Qualität der Microarrays um bis zu 65% gesteigert werden.

Es ist davon auszugehen, dass ein Spacer, welcher direkt am Aptamer integriert ist, zu einer höheren Funktionalität des Aptamers beiträgt. In Falle der modifizierten Oberflächen tragen

die immobilisierten molekularen Spacer zu einer erhöhten Wechselwirkung mit den Aptameren bei. Diese Problematik wird bei der Verwendung integrierter Spacer umgangen. Die durchgeführten Untersuchungen der Detektion His-getaggtter Proteine auf *Forward-Phase*-Microarrays ergaben, dass die Funktionalität der immobilisierten Aptamere in erster Linie von der Oberfläche und dem molekularen Spacer abhängt. Es konnte His-getaggte PFEI auf kommerziellen sowie selbst modifizierten Microarrays mit Nachweisgrenzen im nanomolaren Bereich detektiert werden. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Verwendung eines intramolekularen Spacers am Aptamer die Funktionalität und somit die Bindungseffizienz maßgeblich steigert.

2.4.1.2 Reverse-Phase-Assay

Die Detektion von Proteinen im *Reverse-Phase*-Format wird häufig mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt. Ein großer Vorteil dieses Assays ist die markierungsfreie Detektion einer Vielzahl an Proben in einem Experiment. Um die Anwendbarkeit von Aptameren als Detektionsmoleküle zu untersuchen, wurde ein *Reverse-Phase*-Assay zur Detektion von His-getaggtten Proteinen mit Aptameren entwickelt. Hierfür wurden die Proteine auf kommerziell erhältlichen aldehydmodifizierten bzw. nitrocellulosebeschichteten Microarrays immobilisiert und nach einem Blockierungsschritt mit BSA und mehreren Waschschritten, mit Cy3-markiertem Aptamer 6H7 inkubiert.

Verschiedene Parameter wurden dabei untersucht und optimiert. Zum einen die verwendete Oberfläche, aber auch die optimale Aptamerkonzentration sowie der Einfluss der Position des Fluorophors am Aptamer. Zusätzlich konnte aufgrund der hohen Spezifität des entwickelten Assays die Detektion von Proteinen aus Zelllysaten realisiert werden.

Proteinbindungskapazitäten

Der wichtigste Schritt in der Entwicklung eines *Reverse-Phase*-Assays ist die Immobilisierung der Targetproteine. Eine geringe Proteinbindungskapazität der Oberfläche führt zu schwachen Signalintensitäten, während zu hohe Proteinbindungskapazitäten die Erreichbarkeit des Bindungsepitops des Proteins vermindern können. Verschiedene Publikationen haben bereits die Vorteile von Nitrocellulose als Substrat für die Immobilisierung von Protein heraus gestellt [4, 125, 158]. Auf nitrocellulosebeschichteten Microarrays können Proteine mit hoher Bindungseffizienz und unter Erhalt ihrer nativen

Konformation gekoppelt werden. Der Grund dafür liegt in der dreidimensionalen und netzartigen Struktur der Nitrocellulose.

Um die Proteinbindungskapazitäten der verwendeten Oberflächen zu vergleichen, wurde Cy3-markierte PFEI-his in verschiedenen Mengen (10,4 fmol bis 0,003 fmol) auf aldehydmodifizierten und nitrocellulose-beschichteten Microarrays gespottet. Dabei wurde im Falle der Nitrocelluloseslides der kontaktfreie Spotter verwendet und für die Aldehydslides beide Spotter getestet. Nach dem Blocken und dem Abwaschen ungebundener Proteine wurde die relative Signalintensität ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.34 dargestellt.

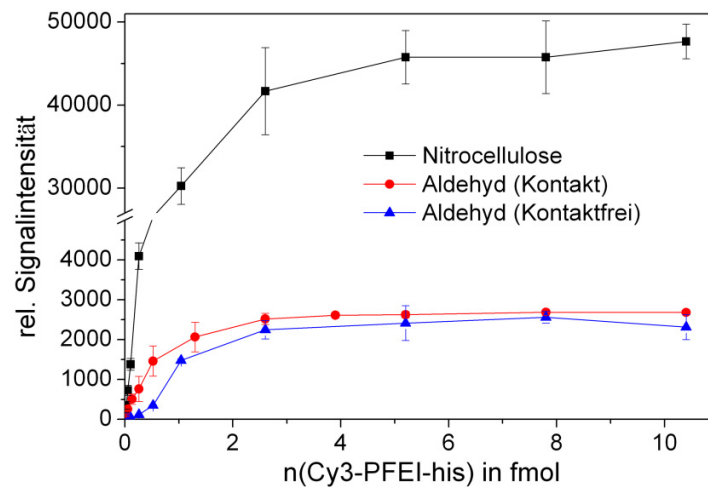


Abbildung 2.34 Relative Signalintensitäten in Abhängigkeit der Menge an gespotteter Cy3-markierter PFEI-his auf Nitrocellulose- und Aldehydslides (PMT-Gain: 400).

Wie zu erwarten, werden mit Nitrocelluloseslides sehr viel höhere relative Signalintensitäten erreicht als mit Aldehydslides. Wird davon ausgegangen, dass die Signalintensität ein Maß für die Anzahl an immobilisierten fluoreszenzmarkierten Proteinen ist, so ist die Bindungskapazität der Nitrocelluloseoberflächen wesentlich höher als die der zweidimensionalen aldehydmodifizierten Glasslides. Desweiteren zeigen die Ergebnisse, dass die verwendete Spotting-Technik keinen Einfluss auf die Menge an immobilisiertem Protein hat.

Die Nitrocellulose scheint für die Immobilisierung der His-getaggtten Proteinen besser geeignet zu sein als die aldehydmodifizierten Oberflächen. In einem nächsten Schritt muss getestet werden ob das Detektionsaptamer trotz der hohen Immobilisierungsdichte den His-Tag des Proteins noch erkennen und binden kann.

Optimale Aptamerkonzentration

Es sollte für möglichst hohe SNR-Werte der Bereich der optimalen Aptamerkonzentration für jeden *Reverse-Phase-Microarray* bestimmt werden. Hierfür wurde aufgereinigte PFEI-his in einer Konzentration von 1 mg/mL in 1 x PBS mit dem kontaktfreien Spotter auf die Aldehyd- und Nitrocelluloseslides gespottet und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cy3-markierten 6H7 (fluoreszenzmarkiert am 3'- bzw. 5'-Ende) in dem Bindungspuffer PBST-6H7 inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen lagen in einem Bereich von 0,003 µg/mL (0,2 nM) bis 10 µg/mL (790 nM).

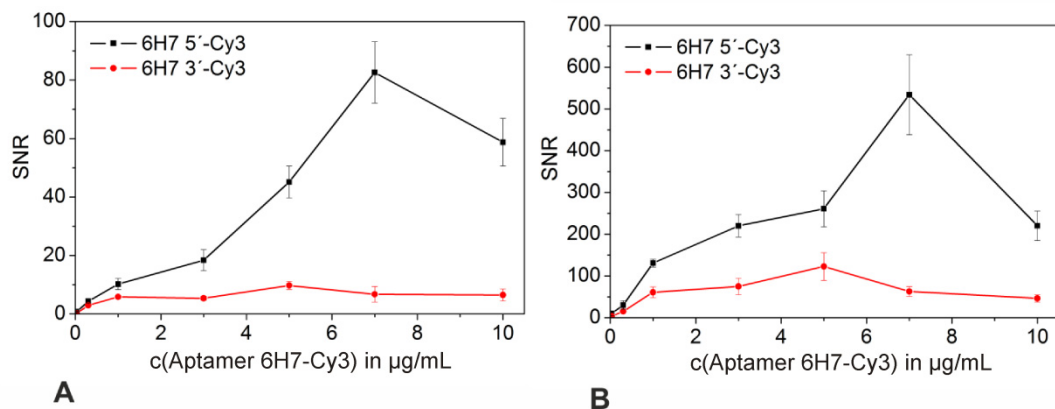


Abbildung 2.35 Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration zur Detektion von PFEI-his im *Reverse-Phase-Format*. Aufgetragen ist die Konzentration an Cy3-markiertem Aptamer 6H7 in Abhängigkeit von der SNR für (A) Aldehyd- und (B) Nitrocelluloseslides.

Bei Betrachtung der Abbildung 2.35 fällt auf, dass die Nitrocelluloseslides viel höhere SNR-Werte als die Aldehydslides aufweisen. Dies ist auf die hohe Proteinbindungskapazität der Nitrocellulose zurückzuführen. Trotz dieser hohen Dichte an immobilisierten Proteinen kann das Detektionsaptamer den His-Tag der PFEI also noch ausreichend erreichen und binden.

Für beide Oberflächen wurden dennoch hinsichtlich der optimalen Aptamerkonzentration die gleichen Ergebnisse erhalten. Auf beiden Oberflächen beträgt sie 5 µg/mL (390 nM) für das 3'-Cy3-markierte 6H7 und 7 µg/mL (550 nM) für das 5'-Cy3-markierte 6H7 (Abbildung 2.35 A und B). Bei noch höheren Konzentrationen verringerte sich die SNR, da zu viele Detektionsmoleküle an den Hintergrund binden. In allen weiteren Experimenten wurde mit diesen optimalen Aptamerkonzentrationen gearbeitet.

Einfluss der Position des Fluorophors

Da bereits im *Forward-Phase*-Format die Immobilisierungsrichtung des Aptamers Einfluss auf die Funktionalität der Aptamere hatte, wurde auch im *Reverse-Phase*-Format der Einfluss der Position des Fluorophors am Aptamer untersucht. Abbildung 2.35 zeigte bereits die erhöhten Signalintensitäten bei Verwendung des Aptamers 6H7, welches am 5'-Ende Cy3-modifiziert ist. Der *Reverse-Phase*-Assay zur Detektion von PFEI-his wurde mit den ermittelten optimalen Aptamerkonzentrationen auf beiden Oberflächen wiederholt und die Ergebnisse gegenüber gestellt. Neben der relativen Signalintensität ist auch die SNR in Abbildung 2.36 dargestellt.

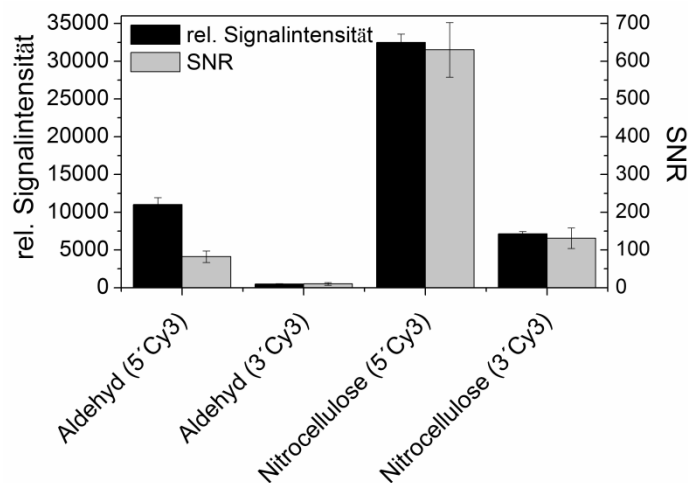


Abbildung 2.36 Einfluss der Position des Cy3 am Aptamer 6H7 auf die Targetbindung (PFEI-his, 1 mg/mL) im *Reverse-Phase*-Format. Aufgetragen sind die relativen Signalintensitäten und die SNR für Aldehyd- und Nitrocelluloseslides.

Sowohl bei den aldehydmodifizierten Slides als auch bei den Nitrocelluloseslides zeigte das 5'-Cy3-markierte Aptamer deutlich höhere Signalintensitäten und SNR-Werte. Vermutlich ist das 5'-Ende des 6H7-Aptamers nicht an der Targetbindung beteiligt, eine Modifizierung an dieser Position wirkt sich somit nicht negativ auf die Funktionalität des Aptamers aus. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen im *Forward-Phase*-Format. Das Aptamer 6H7 zeigte dort bessere Bindungserfolge, wenn es über das 5'-Ende immobilisiert wurde (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

Nachweisgrenze des Assays

Für eine Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) des entwickelten *Reverse-Phase*-Microarrays wurde das Targetprotein PFEI-his in einer Konzentrationsreihe von 0,001 bis 2

mg/mL auf Aldehyd- und Nitrocelluloseslides immobilisiert. Die Detektion fand mit 5'-Cy3-markiertem 6H7 statt.

Die Abbildung 2.37 zeigt die beiden Slides (Immobilisierung der PFEI-his mit kontaktfreiem Spotter) und die SNR in Abhängigkeit von der PFEI-Konzentration. Während auf Aldehydslides (Abbildung 2.36 A) auch bei den geringsten Konzentrationen von 0,001 mg/mL und 0,005 mg/mL ein Signal zu erkennen ist, ist die Detektion auf Nitrocelluloseslides (Abbildung 2.36 B) nur bis zu einer PFEI-Konzentration von 0,01 mg/mL möglich.

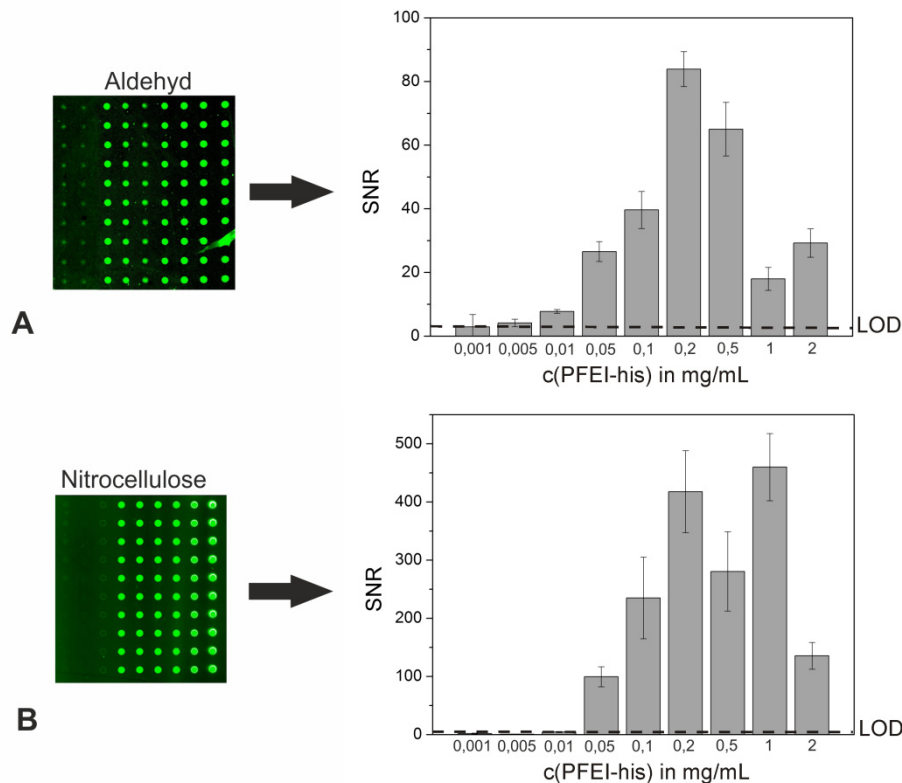


Abbildung 2.37 Bestimmung der Nachweisgrenze zur Detektion von PFEI-his im *Reverse-Phase*-Format. Gezeigt sind die Scans und die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration der PFEI-his auf (A) Aldehyd- und (B) Nitrocelluloseslides nach Inkubation mit 5'-Cy3-markiertem 6H7. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar.

Als Maß für die Nachweisgrenze wurde die SNR herangezogen. Die niedrigste Konzentration bei der die $SNR \geq 3$ war, ist die Konzentration an Protein, welche gerade noch detektierbar ist. Die Tabelle 2.5 listet die bestimmten LOD-Werte auf. Bei Verwendung der Aldehydslides liegt die Nachweisgrenze mit $0,03 \mu\text{M}$ um ein zehnfaches tiefer als bei Nitrocelluloseslides, welche eine LOD von $0,3 \mu\text{M}$ aufweisen. Trotz der höheren maximal erreichten SNR, können auf Nitrocellulose kleine Proteinkonzentrationen weniger gut nachgewiesen werden. Möglicherweise diffundieren kleine Proteinmengen vollständig in die dreidimensionale

Struktur der Oberfläche, wo sie von dem Detektionsaptamer nur schwer erreicht werden können.

Tabelle 2.5 Nachweisgrenzen (LOD) in $\mu\text{g/mL}$ und maximale SNR-Werte zur Detektion von PFEI-his mit 5'-Cy3-markiertem Aptamer 6H7 im *Reverse-Phase*-Format.

Oberfläche	LOD	SNR
Nitrocellulose	10 (0,3 μM)	772
Aldehyd (kontaktfreier Spotter)	1 (0,03 μM)	83
Aldehyd (Kontakt-Spotter)	50 (1,5 μM)	60

Desweiteren führt die Verwendung des Kontakt-Spotters zu einer fünfmal schlechteren Nachweisgrenze von 1,5 μM . Ebenso sind die SNR-Werte kleiner, was auf eine nicht effiziente Bindung des Aptamers an die PFEI-his bei Verwendung des Kontakt-Spotters hindeutet. Vermutlich führt die vergleichsweise schonende, unter hoher Luftfeuchtigkeit stattfindende, kontaktfreie Immobilisierung der PFEI-his zu einer besseren Ausrichtung bzw. vermindert eine Strukturänderung des Proteins beim Bindungsvorgang.

Detektion von GFP-his

Da der Einsatz von anti His-Tag-Aptamern die Detektion verschiedener His-getagter Proteine ermöglichen soll, wurde desweiteren GFP-his auf einem Aldehydslide immobilisiert und mit 5'-Cy3-markiertem 6H7 nachgewiesen. Die Abbildung 2.38 zeigt zum einen den Scan des Microarrays sowie die SNR in Abhängigkeit von der Konzentration an GFP-his.

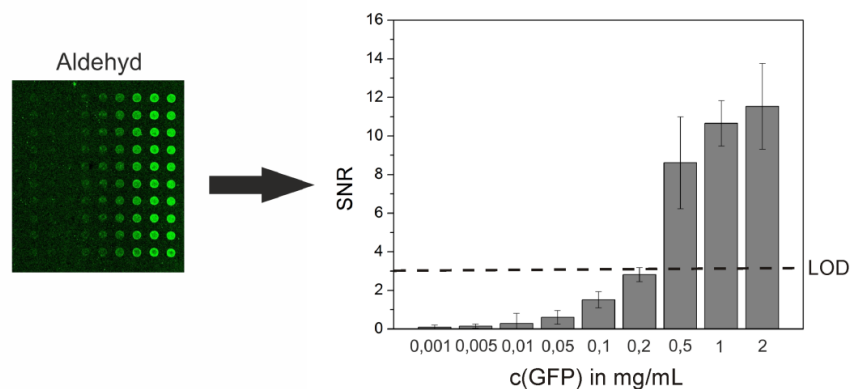


Abbildung 2.38 Bestimmung der Nachweisgrenze zur Detektion von GFP-his im *Reverse-Phase*-Format. Gezeigt sind die Scans und die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des GFP-his auf Aldehydslides nach Inkubation mit 5'-Cy3-markiertem 6H7. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 600).

Generell ist die Detektion von GFP-his mithilfe des Cy3-markierten 6H7 Aptamers möglich. Jedoch nimmt die Intensität der Spots schon ab einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL rapide ab. Ab 0,2 mg/mL sinkt die SNR unter die Nachweisgrenze. Trotz gleicher *Dye-to-Protein*-Ratio der beiden Proteine GFP-his und PFEI-his von 0,8 wurden im *Reverse-Phase*-Assay für GFP-his viel niedrigere Signalintensitäten und SNR-Werte erhalten. Während die LOD für PFEI bei 0,03 μ M auf Aldehydslides liegt, beträgt die LOD für GFP-his nur 7,4 μ M. Eine mögliche Erklärung für die schlechte Detektierbarkeit von GFP-his könnte in einer schlechteren Erreichbarkeit des His-Tags für das 6H7 Aptamer sein. Eventuell ist der His-Tag im GFP durch die Proteinfaltung sterisch nur schwer zugänglich, was die Detektion mittels Aptamer behindert. Ebenso könnten elektrostatische Effekte die Bindung des Aptamers an den His-Tag behindern. Diese Feststellung korreliert mit den Ergebnissen des *Forward-Phase*-Assay (siehe Abschnitt 2.4.1.1). Das GFP-his zeigte auch dort eine schlechtere Detektierbarkeit auf als die PFEI-his.

Detektion aus Zelllysate

In einem weiteren Experiment wurde die Anwendbarkeit des entwickelten aptamerbasierten *Reverse-Phase*-Assays für die Detektion von His-getaggen Proteinen in Zelllysaten getestet. Die Detektion von Proteinen in komplexen Proben ist unter anderem für die Überwachung von Herstellungs- und Aufreinigungsprozessen von Vorteil. Durch eine Probenahme während der Proteinherstellung in Bioreaktoren könnte mit diesem Assay eine schnelle und vor allem gut parallelisierbare Detektion des Proteins erfolgen.

Da sich in Zelllysaten neben dem Zielprotein auch eine Vielzahl anderer Proteine befinden, wurde zunächst die Spezifität des verwendeten Aptamers 6H7 untersucht. Hierfür wurde neben PFEI-his auch BSA und ein *E. coli* K12 Zelllysate (ohne PFEI-his) in einer Konzentration von 1 mg/mL auf Aldehyd- und Nitrocelluloseslides gespottet. Nach dem Auslesen der Microarrays waren die Signalintensitäten und die SNR-Werte für BSA und das Zelllysate vernachlässigbar gering ($SNR \leq 3$). PFEI-his wurde jedoch mit ausreichender Affinität vom Aptamer gebunden (Daten nicht gezeigt). Das Aptamer 6H7 zeigt somit eine ausreichende Spezifität für die Bindung an die PFEI-his.

Für die Detektion von PFEI-his in Zelllysate wurde das Protein in *E. coli* produziert (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Nach Induktion wurde die Kultivierung 1 h, 2 h, 3 h bzw. 4 h lang

durchgeführt, die Zellen geerntet und das Lysat mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dieses Zelllysate wurde anschließend in einer Konzentration von 1 mg/mL auf Aldehydslide gespottet und anschließend mit 5'-Cy3-markiertem 6H7 Aptamer inkubiert.

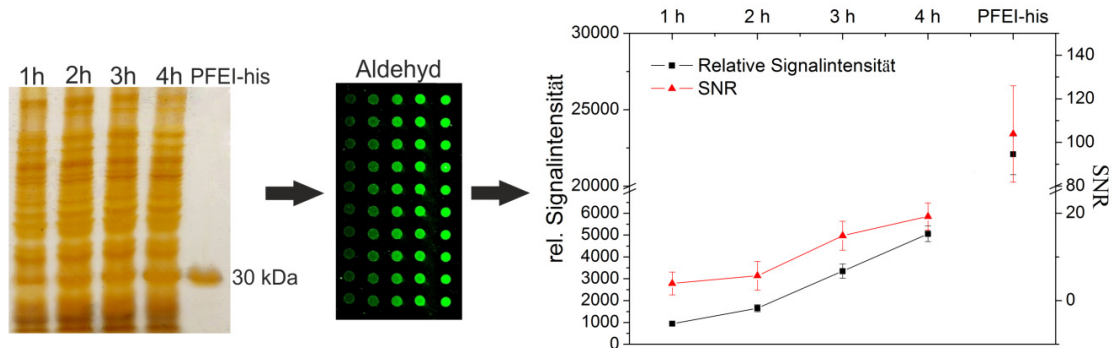


Abbildung 2.39 Detektion von PFEI-his im *E. coli* Zelllysate. Proben: 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach Induktion sowie reine PFEI-his in einer Konzentration von 1 mg/mL analysiert mit SDS-PAGE und Aldehyd-Microarray sowie Vergleich der rel. Signalintensität und SNR (PMT-Gain: 600).

Die Abbildung 2.39 zeigt mit fortschreitender Zeit nach Induktion im SDS-Gel eine ansteigende Konzentration von PFEI-his im Zelllysate. Auf dem Aldehydslide spiegelt sich dies in der Signalintensität der Spots direkt wieder. Die Auswertung in Abbildung 2.39 stellt die relative Signalintensität und SNR der Proben gegenüber. Die SNR nimmt ebenso wie die Signalintensität mit ansteigender Konzentration an PFEI-his im Zelllysate zu. Die SNR-Werte der Zelllysate-Proben liegen mit Werten zwischen 4 und 20 zwar deutlich unter den SNR-Werten der reinen PFEI-his, bewegen sich aber dennoch im detektierbaren Bereich ($SNR \geq 3$). Der Grund dieser niedrigeren SNR-Werte ist die Konkurrenz der Proteine des Zelllysats mit der PFEI-his um die vorhandenen Bindungsplätze auf dem Microarray, wodurch weniger Moleküle des Targetproteins gebunden werden können.

Mithilfe dieses Experiments konnte die generelle Anwendbarkeit des Aptamer *Reverse-Phase*-Microarray für die Detektion von his-getaggtten Proteinen in komplexen Proben erfolgreich gezeigt werden.

Ein großes Problem des entwickelten Assays ist weiterhin die Tatsache, dass die tatsächliche Menge an gebundenem Protein in einem Spot nicht bekannt ist. Um eine Aussage über die Konzentration der PFEI-his in komplexen Proben zu erhalten, ist die Verwendung einer Konzentrationsreihe von PFEI-his auf demselben Microarray denkbar. Wird jedoch eine reine Lösung PFEI gespottet so sind die Signalintensitäten nur mäßig mit denen einer

Proteinmischung zu vergleichen. Die Zugänglichkeit des His-Tag kann nämlich durch die Immobilisierung weiterer Proteine in demselben Spot beeinflusst sein bzw. weniger PFEI-his wird in einem Spot gebunden, da verschiedene Proteinmoleküle um die Bindungsstellen auf der Oberfläche konkurrieren. Mit zunehmender Konzentration an Zelllysatsproteinen bei gleichbleibender PFEI-Konzentration sollte sich die relative Signalintensität auf dem Microarray also verringern.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde jeweils PFEI-his mit verschiedenen Konzentration an fetalem Kälberserum (FCS: *fetal calf serum*) vermischt und auf Aldehydslides immobilisiert. In jeder Probe lag eine Konzentration an PFEI-his von 1 mg/mL vor.

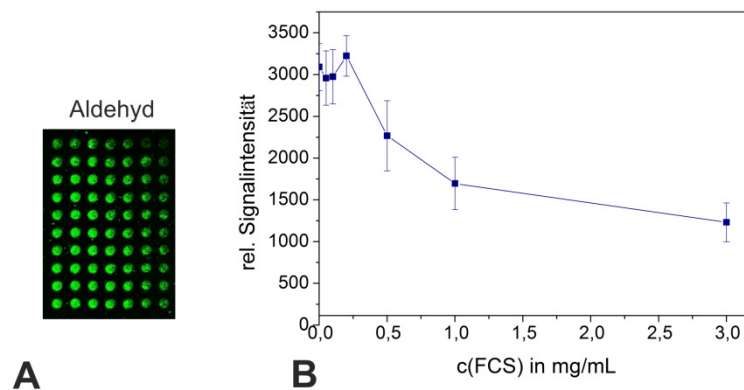


Abbildung 2.40 Abhängigkeit der relativen Signalintensität von der Konzentration des Zelllysats (FCS) für die Detektion von 1 mg/mL PFEI-his. (A) Scan des Aldehydslides und (B) Darstellung der relativen Signalintensität in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration (PMT-Gain: 600).

Die Abbildung 2.40 zeigt, dass mit zunehmender Konzentration des FCS die gemessene Signalintensität bei gleichbleibender PFEI-Konzentration abnimmt. Eine deutliche Verringerung der Intensität ist schon ab einer gesamten Proteinkonzentration von 1,2 mg/mL zu beobachten. Anhand dieser Erkenntnis ist es für die Detektion von Proteinen aus Zelllysaten mithilfe *Reverse-Phase*-Microarrays wichtig, zu hoch konzentrierten Proben vor der Analyse zu verdünnen, um eine Überschreitung der Bindungskapazität der Oberfläche zu umgehen [158]. Nitrocelluloseslides könnten zur Detektion von Proteinen aus komplexen Proben aufgrund der höheren Bindungskapazität besser geeignet sein als die hier verwendeten Aldehydslides.

Diese Versuche zeigen, dass eine akkurate Quantifizierung von His-getaggtten Proteinen in Zelllysaten auf Aldehydslides nur durchführbar ist, wenn die Gesamtproteinkonzentration in

der Probe kleiner als 1,2 mg/mL ist, da bis zu dieser Konzentration die „Fremdproteine“ wenig Einfluss auf die Bindung und Detektion der PFEI-his haben.

Antikörper und Aptamer im Vergleich

Zum direkten Vergleich von Aptamer und Antikörper als Detektionsmolekül auf *Reverse-Phase*-Microarrays wurde die Detektion von PFEI-his auf Nitrocellulose- und Aldehydslides mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen His-getaggte Proteine (Penta-his, *Alexa Fluor 555 Conjugate*, Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst analog zu dem 6H7-Aptamer die optimale Konzentration an Antikörper ermittelt. Diese betrug 7 µg/mL (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde die Detektion von PFEI-his auf Nitrocellulose- und Aldehydslides durchgeführt. In Abbildung 2.41 sind die Ergebnisse im Vergleich mit dem aptamerbasierten Assay dargestellt. Sowohl die relative Signalintensität als auch die SNR-Werte sind bei Verwendung des Aptamers deutlich höher. Die Scans der Microarrays zeigen jedoch, dass der Antikörper auch bei kleinen PFEI-Konzentrationen noch ein Signal liefert.

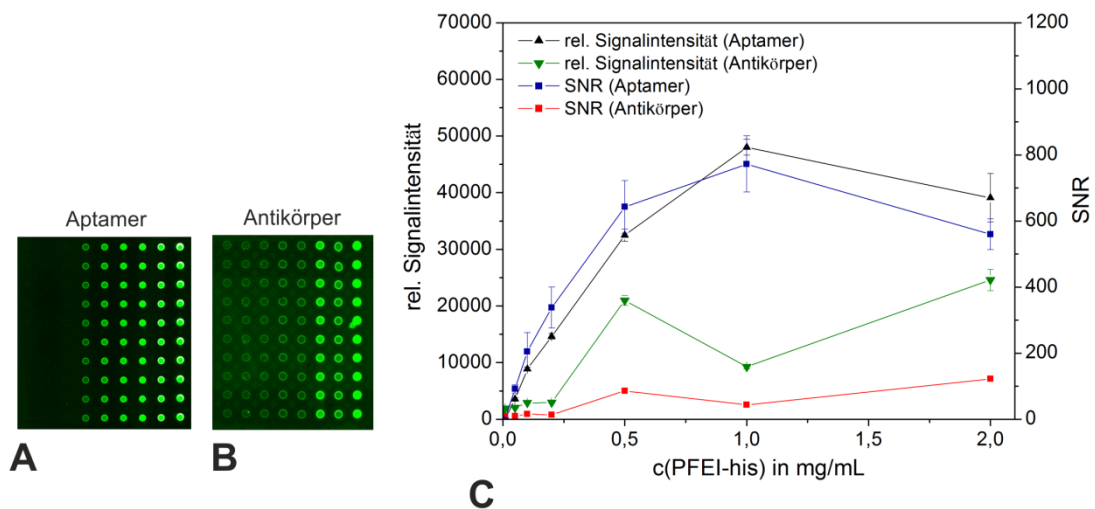


Abbildung 2.41 Vergleich von Cy3-markiertem Aptamer und Antikörper als Detektionsmolekül auf *Reverse-Phase*-Microarrays. Nitrocelluloseslides nach Inkubation mit (A) fluoreszenzmarkiertem Aptamer 6H7 (5'-Cy3) und (B) Antikörper. (C) Vergleich der relativen Signalintensität und SNR-Werte für die Detektion von PFEI-his mit dem Aptamer bzw. Antikörper (PMT-Gain: 300).

In Tabelle 2.6 sind die LOD-Werte des Aptamer- und Antikörper-Assays aufgelistet. Auf Nitrocelluloseslides weist der antikörperbasierte Microarray mit 0,15 µM trotz insgesamt geringfügig kleinerer SNR-Werte eine niedrigere Nachweisgrenze als der Aptamer-Microarray (0,3 µM) auf. Bei den Aldehydslides resultiert die Anwendung des Aptamers hingegen in einer deutlich geringere Nachweisgrenze von 0,03 µM. Mit dem Antikörper

konnte auf Aldehydslides nur eine Nachweisgrenze von 1,5 μM erzielt werden. Dies deutet darauf hin, dass das negativ geladene Aptamer elektrostatisch von der negativ geladenen Nitrocellulose abgestoßen und somit die Bindung an das immobilisierte Zielmolekül erschwert wird [159].

Tabelle 2.6 LOD-Werte der aptamer- und antikörperbasierten *Reverse-Phase*-Microarrays in $\mu\text{g/mL}$ zur Detektion von PFEI-his.

Oberfläche	LOD ^{Aptamer}	LOD ^{Antikörper}
Nitrocellulose	10 (0,3 μM)	5 (0,15 μM)
Aldehyd (kontaktfreier Spotter)	1 (0,03 μM)	50 (1,5 μM)
Aldehyd (Kontakt-Spotter)	50 (1,5 μM)	500 (15 μM)

Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer zur Detektion von Proteinen auf *Reverse-Phase*-Microarrays alternativ zu konventionell verwendeten Antikörper unter sorgfältiger Auswahl einer geeigneten Oberfläche sehr gut eingesetzt werden kann.

2.4.1.3 Zusammenfassung: Detektion His-getaggtter Proteine

Mithilfe des Aptamers 6H7 gegen Histidine-Tag konnte die generelle Anwendbarkeit von Aptameren auf Microarrays, sowohl im *Forward-Phase* als auch *Reverse-Phase*-Format gezeigt werden.

Im *Forward-Phase*-Format konnte die Abhängigkeit der Aptamerfunktionalität von der Oberfläche sowie der Position des molekularen Spacers bestätigt werden. Es konnten alle drei his-getaggtten Proteine, PFEI, GFP und Bgl detektiert werden, wobei die Bindung des Aptamers an PFEI-his am besten war. Die Tabelle 2.7 zeigt eine Auswahl der getesteten Oberflächen und Spacer, sortiert nach ihren in dieser Arbeit erhaltenen maximalen SNR-Werten für die Detektion von PFEI-his. Diese Zusammenfassung macht deutlich, dass die Verwendung eines intramolekularen Spacers am Aptamer mit Abstand die besten Ergebnisse liefert. Die drei selbst modifizierten Oberflächen zeigen SNR-Werte im Bereich von 23 bis 47, was über den Werten der kommerziellen Epoxy-PEG-Slides sowie der PEI-modifizierten Aldehydslides liegt.

Tabelle 2.7 Vergleich der getesteten Oberflächen hinsichtlich der *Signal-to-Noise-Ratio* (SNR) für die Detektion von PFEI-his im *Forward-Phase*-Format mit dem Aptamer 6H7.

Oberfläche	SNR _{max}
PEI-Aldehyd	12
Epoxy-PEG	17
Amino „kurz-verzweigt“	23
Aldehyd „lang-verzweigt“	25
Epoxy „lang-verzweigt“	47
Epoxy + 10T-HEG-Spacer am Aptamer	60
Aldehyd + 10T-HEG-Spacer am Aptamer	72

Da die Herstellung der spacermodifizierten Microarrays sehr zeitaufwendig ist und eine Vielzahl an Chemikalien benötigt wird, sind diese Oberfläche jedoch für einen häufigen Gebrauch wenig geeignet. Für erste Optimierungen eines aptamerbasierten *Forward-Phase*-Assays hinsichtlich der Immobilisierungsrichtung, sowie Inkubierungs- und Waschbedingungen sind die PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Slides zu empfehlen. Für die zukünftige Etablierung eines aptamerbasierten Microarrays zur Detektion von Proteinen ist es empfehlenswert, die Aptamere mit geeigneten Spacern (z.B. T10-HEG) modifizieren zu lassen, um so eine noch höhere Funktionalität der Aptamere erreichen zu können.

Durch die Anwendung des fluoreszenzmarkierten Aptamers 6H7 konnte die Bindung auch an immobilisierte His-getaggte Proteine realisiert werden. Es stellte sich heraus, dass die Verwendung von 5'-Cy3-gelabeltem Aptamer 6H7 bessere Ergebnisse lieferte als das entsprechende 3'-Cy3-markierte Aptamer. Die Detektion von PFEI-his, GFP-his und Bgl-his konnte auf Nitrocellulose sowie Aldehyd realisiert werden. Aufgrund der hohen Spezifität konnte desweiteren die Anwendung des Assays für die Detektion His-getaggtter Proteine aus komplexen Proben gezeigt werden.

Die Tabelle 2.8 stellt die Nachweisgrenzen der beiden entwickelten Assays auf verschiedenen Oberflächen gegenüber. Der *Forward-Phase*-Microarray weist eine LOD von 3,3 nM auf. Die Detektion von PFEI-his ist aufgrund der limitierenden Immobilisierung des Proteins im *Reverse-Phase*-Format weniger effektiv. Die Werte lagen hier je nach Oberfläche und

verwendeter Spotting-Methode in einem Bereich von 30 nM bis 1500 nM. Unter den gleichen Bedingungen zeigten die Aldehydslides mit 30 nM eine 10fach geringere LOD als die Nitrocelluloseslides (LOD: 300 nM). Erstaunlich ist, dass laut Walter *et al.* (2010) antikörperbasierte *Reverse-Phase*-Microarrays ein umgekehrtes Verhalten aufweisen. Dort konnten auf Nitrocelluloseslides viel bessere Nachweisgrenzen nachgewiesen werden als auf zweidimensionalen Aldehydslides [5]. Eine Begründung könnte in der Ladung der Nitrocellulosemembran liegen. Vermutlich wird das negativ geladene Aptamer von der negativ polarisierten Nitrocellulose abgestoßen und kann nur schlecht in die Poren der Membran eindringen und das Targetprotein binden.

Tabelle 2.8 Zusammenfassung der erreichten Nachweisgrenzen (LOD) der Detektion von PFEI-his auf aptamerbasierten Microarrays im *Forward*- und *Reverse-Phase*-Format.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
5 nM (PEG-Epoxy)	300 nM (Nitrocellulose)
3,3 nM (PEI-Aldehyd)	30 nM (Aldehyd (kontaktfrei))
	1500 nM (Aldehyd (kontakt))

Zusammenfassend gesehen ist zum Aufbau eines aptamerbasierten Microarrays eine sorgfältige Auswahl und Optimierung der Oberfläche notwendig. Bereits vorhandene Verfahren und Protokolle von antikörperbasierten Microarrays lassen sich nicht direkt auf Aptamer-Microarrays übertragen.

Im Folgenden wird überprüft, inwiefern auf Basis der hier entwickelten und optimierten Microarray-Protokolle, weitere aptamerbasierte Assays zur Detektion anderer Proteine hergestellt werden können. Da die hier verwendeten Aptamere lediglich eine Aminosäuresequenz (Polyhistidin) erkennen und binden, wäre es in einem nächsten Schritt interessant festzustellen, ob sich auch die Detektion komplexerer Targetstrukturen wie Antikörper oder VEGF auf Aptamer-Microarrays durchführen lässt.

2.4.2 Detektion von Immunoglobulinen

Um eine Detektion von Antikörpern mit aptamerbasierten Microarrays zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma AptaRes eine MonoLEX gegen humanes F_c-Fragment

durchgeführt. Aus dieser Selektion wurden insgesamt zehn Aptamersequenzen (264 - 273) erhalten. Diese wurden zunächst in einem Screening auf Microarrays im *Forward-Phase*-Format sowohl hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten gegenüber humanem F_c-Fragment, als auch gegenüber kompletten Antikörper untersucht. Beide Moleküle konnten von allen immobilisierten zehn Sequenzen gebunden werden. Die Verwendung der drei Aptamere 264, 265 und 266 führte jedoch zu den stärksten Fluoreszenzsignalen auf den Microarrays (Daten nicht gezeigt).

Für die Entwicklung und nähere Charakterisierung der verschiedenen Microarray-Formate wurden nur diese drei Aptamere verwendet. Zunächst wurde im *Forward-Phase* und *Reverse-Phase*-Format die Nachweisgrenzen bestimmt sowie die Spezifität der Aptamere untersucht. Desweiteren wurde eine Detektion im Sandwich-Format realisiert. Hierbei bindet ein immobilisiertes Aptamer das F_c-Fragment über die eine Untereinheit, während ein weiteres, fluoreszenzmarkiertes Aptamer die andere Untereinheit bindet. In Edwards *et al.* (2010) werden diese beiden Aptamere als „*Captamer*“ und „*Detectamer*“ bezeichnet [160].

Die optimierten Protokolle zur Detektion von F_c-Fragmenten sowie Immunoglobulinen mit aptamerbasierten Microarrays sind im Anhang (Seite 152) zu finden.

2.4.2.1 *Forward-Phase-Assay*

Zur Durchführung des *Forward-Phase-Assays* wurde auf die vorhandenen Protokolle, welche zur Detektion von His-getaggten Proteinen entwickelt wurden, zurückgegriffen. Die drei ausgewählten Aptamere 264, 265 und 266 wurden über ihren C₆-Aminolinker an Cyanurchlorid gebunden. Diese Aktivierung ermöglicht in einem nächsten Schritt eine gerichtete Kopplung der Aptamere an PEI-modifizierte Oberflächen. Da sich in den vorangegangenen Studien (siehe Abschnitt 2.4.1.1) herausgestellt hat, dass PEG-modifizierte Slides ebenfalls die Funktionalität der immobilisierten Aptamere unterstützen, wurde die Detektion des F_c-Fragments und der Immunoglobuline zusätzlich auf Epoxy-PEG-Oberflächen getestet.

Optimierung des Forward-Phase-Assays

Zunächst wurde eine Protokolloptimierung für die anti F_c-Aptamere vorgenommen. Durch die Entfernung des Denaturierungsschrittes vor der Inkubation mit den Zielproteinen konnte die

Bindung des Zielproteins maßgeblich verbessert werden. Vermutlich begünstigt im Falle des 6H7-Aptamers eine Denaturierung die korrekte Aptamerfaltung, da dieses Aptamer während der SELEX mehreren Denaturierungsschritten während der PCR ausgesetzt wurde. Die anti F_c-Aptamere wurden hingegen mit der MonoLEX hergestellt, welche keine PCR zur Amplifikation beinhaltet.

Die Abbildung 2.42 zeigt die Signalintensitäten der Detektion von Cy3-markiertem F_c-Fragment unter Verwendung der drei Aptamere 264, 265 und 266 auf PEI-Aldehydslides mit sowie ohne Denaturierung. Wird der Aptamer-Microarray ohne Denaturierung und anschließende Faltung der Aptamere mit humanem F_c-Fragment inkubiert, so werden für alle Aptamere höhere Signalintensitäten erhalten. Die Faltung von Oligonukleotiden basiert auf kinetischen Reaktionen und sind somit stark von der Temperatur abhängig. Diese Temperaturabhängigkeit der Aptamerfaltung muss gemäß den Selektionsbedingungen für jedes Aptamer einzeln untersucht werden.

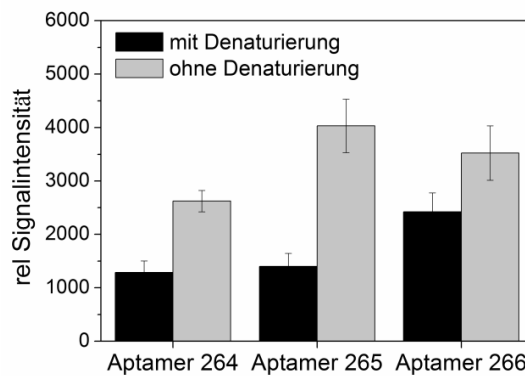


Abbildung 2.42 Einfluss der Denaturierung auf die relativen Signalintensitäten für die Detektion von Cy3-markiertem, humanem F_c-Fragment (5 µg/mL) im *Forward-Phase*-Format mit den Aptameren 264, 265 und 266, immobilisiert in einer Konzentration von 100 µM (PMT-Gain: 600).

Weitere Optimierungsansätze des bereits entwickelten Protokolls für die Detektion von His-getagten Proteinen führten zu keiner Verbesserung der Signalintensitäten und SNR-Werte. Daher wurden alle weiteren Schritte des Protokolls unverändert übernommen.

Die nachfolgenden Ergebnisse basieren auf dem optimierten Protokoll des *Forward-Phase*-Assays ohne Denaturierung sowie unter Verwendung des unveränderten Bindungspuffers.

Vergleich von PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Oberflächen

Um die Funktionalität der drei Aptamere auf den PEI- und PEG-modifizierten Oberflächen zu testen, wurden die Aptamere jeweils in einer Konzentration von 100 µM auf den Slides

immobilisiert und mit Cy3-markiertem F_c -Fragment in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jackson ImmunoResearch) inkubiert.

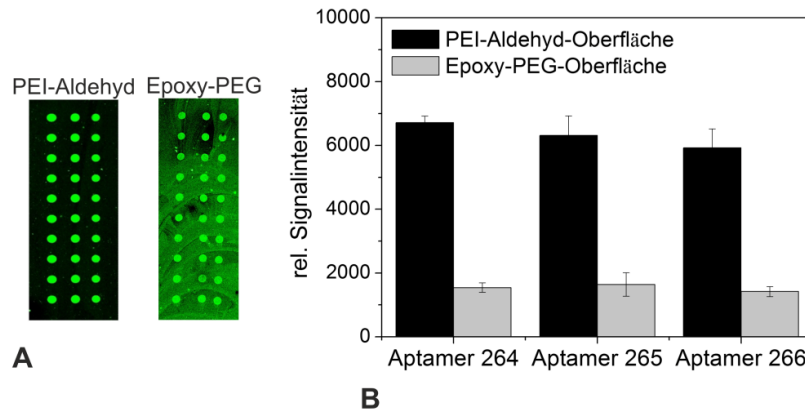


Abbildung 2.43 Vergleich der PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Oberfläche zur Detektion von Cy3-markiertem, humanem F_c -Fragment (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) im *Forward-Phase-Format*. Dargestellt sind (A) die Scans der Microarrays und (B) die relativen Signalintensitäten für die Aptamere 264, 265 und 266, immobilisiert in einer Konzentration von 100 μM (PMT-Gain: 600).

In der Abbildung 2.43 sind die beiden Scans und die relativen Signalintensitäten dargestellt. Der Epoxy-PEG-Slide weist, wie bereits bei der Detektion von His-getaggen Proteinen (siehe Abschnitt 2.4.1.1) ein deutlich höheres Hintergrundsignal als der PEI-Aldehydslide auf. Aus diesem Grund ist die relative Signalintensität vergleichsweise niedrig. Für die Detektion von PFEI-his mit dem Aptamer 6H7 konnten trotz des schlechten Hintergrunds höhere Intensitäten mit den PEG-Slides erhalten werden (siehe Abschnitt 2.4.1.1). Dies trifft für die Detektion von humanem F_c -Fragment nicht zu. Vermutlich weisen die anti F_c -Aptamere eine geringere Funktionalität auf PEG-Slides auf als die anti His-Tag-Aptamere.

Da die PEI-Aldehyd-Oberfläche deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Funktionalität der drei Aptamere lieferte, sind in den folgenden Abschnitten nur die Ergebnisse der PEI-modifizierten Oberflächen dargestellt.

Spezifität der anti F_c -Aptamere

Zur Überprüfung inwiefern die Aptamere nicht nur das humane F_c -Fragment, sondern auch komplette Immunglobuline binden, wurden die immobilisierten Aptamere mit verschiedenen Cy3-markierten Proteinen inkubiert. Neben humanem IgG wurden ebenso IgGs verschiedener

anderer Spezies (Ratte, Ziege, Maus) verwendet. Es wurden dabei polyklonale Antikörper eingesetzt. Zusätzlich wurden als Negativkontrollen PFEI-his und BSA eingesetzt.

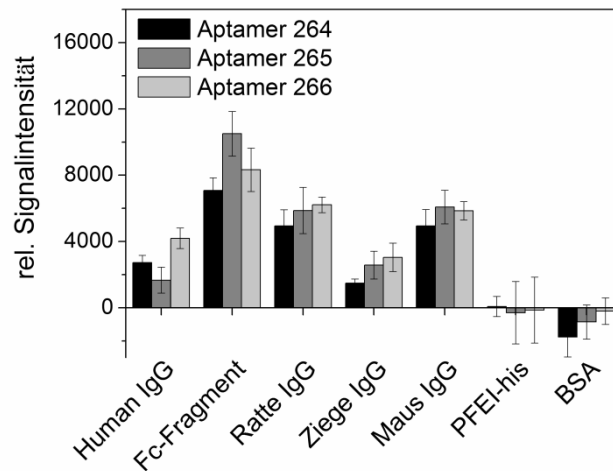


Abbildung 2.44 Untersuchung der Spezifität der anti F_c-Aptamere im *Forward-Phase*-Format auf PEI-Aldehydslides. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten für die Detektion verschiedener Cy3-markierter Proteine (je 5 µg/mL) mit den Aptameren 264, 265 und 266, immobilisiert in einer Konzentration von 100 µM (PMT-Gain: 600).

Die Abbildung 2.44 zeigt die relativen Signalintensitäten für die Detektion verschiedener Proteine mit den drei Aptameren. Da die *Dye-to-Protein*-Ratio bei den verwendeten Proteinen verschieden ist (D/P: 2,2-3,2 (A552/A286), Anhang, Seite 129), geben die Unterschiede kein eindeutigen Hinweis bezüglich der Bindungsaffinitäten der Aptamere gegenüber unterschiedlichen Immunoglobulinen. Vielmehr konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die Aptamere nicht nur das humane F_c-Fragment binden, gegen welches sie selektiert wurden, sondern auch komplette Immunoglobuline verschiedener Spezies. Keine Bindung findet bei PFEI-his und BSA statt. Im Gegensatz hierzu selektierten Miyakawa *et al.* (2008) ein RNA-Aptamer gegen humanes IgG, welches nur IgG1, aber keine anderen IgG-Varianten bindet [161]. Zusammengefasst gesehen weisen die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere 264, 265 und 266 somit vielseitigere Einsatzmöglichkeiten in der Analytik sowie in der Aufreinigung von verschiedenen Antikörpern auf.

Nachweisgrenze des Forward-Phase-Assays

Für das humane F_c-Fragment wurde die Nachweisgrenze im *Forward-Phase*-Format bestimmt. Hierfür wurden die Microarrays mit verschiedenen Konzentrationen an Cy3-

markiertem F_c-Fragment inkubiert. Die Konzentrationen lagen in einem Bereich von 0,1 bis 100 nM (0,005 bis 5 µg/mL).

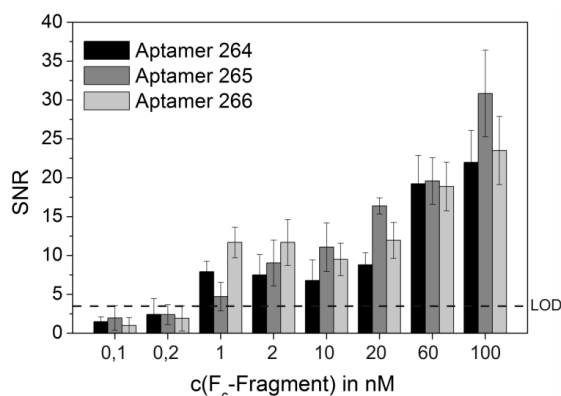


Abbildung 2.45 Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) des *Forward-Phase*-Assays für die Detektion von Cy3-markiertem humanem F_c-Fragment mit den Aptameren 264, 265 und 266. Dargestellt sind die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an humanem F_c-Fragment bei gespotteter Aptamerkonzentration von 100 µM. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 600).

Anhand von Abbildung 2.45 ist zu erkennen, dass für alle drei Aptamere die kleinste, gerade noch nachweisbare Konzentration (SNR ≥ 3) an F_c-Fragment 1 nM (0,05 µg/mL) ist. Somit weist dieser Assay auf Basis der anti F_c-Aptamere im Vergleich zum Aptamer-Microarray zur Detektion von His-getaggten Proteinen (LOD: 3,3 nM) eine vergleichbare Nachweisgrenze auf (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

Der entwickelte *Forward-Phase*-Assay konnte erfolgreich auf die Detektion von humanem F_c-Fragment und verschiedene Immunglobulinen übertragen werden, wobei die besten Ergebnisse unter Verwendung der PEI-Aldehyd-Oberflächen erzielt wurden.

2.4.2.2 *Reverse-Phase*-Assay

Desweiteren sollte gezeigt werden, dass auch mit den anti F_c-Aptameren eine markierungsfreie Detektion im *Reverse-Phase*-Format möglich ist. Vorallem hinsichtlich der potentiellen Anwendung dieser Aptamere in der Diagnostik ist die Entwicklung von *Reverse-Phase*-Microarrays zur schnellen Bestimmung beispielsweise von Antikörpertitern von Vorteil.

Der entwickelte *Reverse-Phase*-Assay konnte ohne weitere Protokolloptimierungen auf die F_c-Aptamere übertragen werden. Zunächst wurde die optimale Aptamerkonzentration

bestimmt. Sie betrug für Nitrocellulose- und Aldehydslides 750 nM (15 µg/mL) (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der höheren Bindungskapazität zeigten Nitrocelluloseslides bessere Ergebnisse hinsichtlich der Signalintensität sowie SNR als die Aldehydslides. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse der Nitrocellulose-Microarrays präsentiert. Der Assay wurde hinsichtlich seiner Spezifität und Nachweisgrenze näher charakterisiert. Desweiteren wurde die Verwendung des Cy3-markierten Detektionsaptamers 264 mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen humanes IgG verglichen.

Vergleich der Spezifität der Aptamere

Um die bereits im *Forward-Phase-Assay* gezeigte Gruppenspezifität der Aptamere (siehe Abschnitt 2.4.2.1) zu bestätigen, wurden die Bindungsaffinitäten der drei Aptamere im *Reverse-Phase-Format* ebenfalls unter Verwendung verschiedener Immunoglobuline untersucht. Es wurden drei Nitrocelluloseslides mit verschiedenen Proteinen (1 mg/mL) bedruckt und mit den fluoreszenzmarkierten Aptameren 264, 265 und 266 in optimaler Konzentration (750 nM) inkubiert. Bei den immobilisierten Proteinen handelt es sich um humanes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und polyklonales humanes IgG, Maus IgG sowie humanes F_c-Fragment. Zusätzlich wurden die Proteinlösungen FCS, BSA und PFEI-his als Negativkontrollen gepottet.

Das Aptamer 264 bindet nahezu alle Proteine mit der höchsten Affinität (Abbildung 2.46). Die anderen Aptamere, 265 und 266, zeigen beide deutlich geringere Signalintensitäten für alle Proteine, was für eine geringere Bindungsaffinität dieser Aptamere an die Zielmoleküle spricht. Generell werden wie im *Forward-Phase-Assay* (siehe Abschnitt 2.4.2.1) neben dem F_c-Fragment auch die anderen Immunoglobuline gebunden, was die Gruppenspezifität der Aptamere erneut bestätigt.

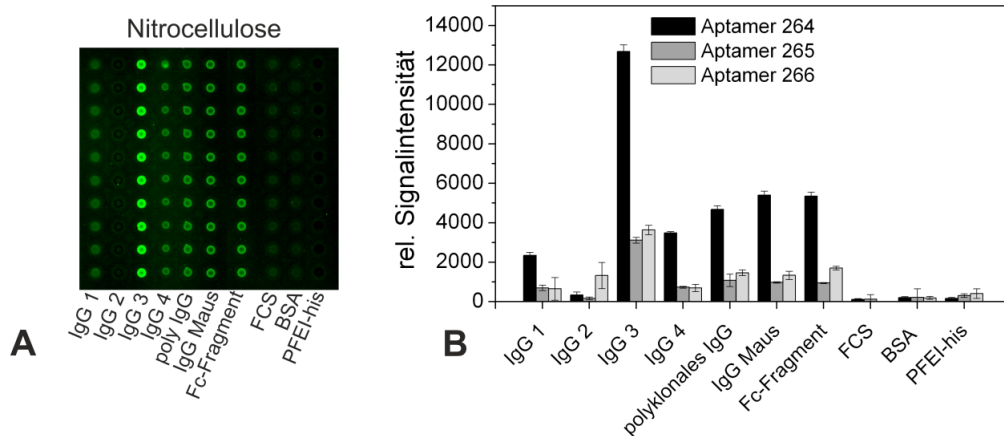


Abbildung 2.46 Spezifität der anti F_c -Aptamere 264, 265 und 266 im *Reverse-Phase-Format*. Dargestellt sind (A) der Scan des Nitrocelluloseslides und (B) die relativen Signalintensitäten für die Detektion der verschiedenen Cy3-markierten Immunoglobuline, humanes F_c -Fragment und der Negativkontrollen FCS, BSA und PFEI-his (PMT-Gain: 250).

Bei Betrachtung der Signalintensitäten für die Detektion der verschiedenen Immunoglobuline fällt besonders die hohe Affinität der Aptamere für Immunoglobulin 3 auf. Eine mögliche Erklärung könnte die Struktur des Antikörpers liefern. Die Struktur des humanen Immunoglobulins unterscheidet sich von den anderen IgGs (IgG1, 2 und 4) in einer besonders langen Gelenkregion (*Hinge-Region*) (siehe Abschnitt 2.2.2, Abbildung 2.5). Dies erhöht einerseits die Flexibilität des Antikörpers und somit möglicherweise die Zugänglichkeit der Targetstruktur für das Aptamer. Zum anderen befindet sich in dieser Region eine replizierte Aminosäuresequenz (PKSCDTPPPCPRCP)¹⁴, welche ebenso die Bindung des Aptamers begünstigen könnte.

An die drei Negativkontrollen findet keine Bindung der Aptamere statt. Aufgrund dieser hohen Spezifität bezüglich anderer Proteine und Proteinmischungen, wie fetalem Kälberserum, ist es generell möglich, humanes Immunoglobulin beispielsweise aus einer komplexen Lösung zu detektieren, was den Anwendungsbereich dieses Assays enorm erweitert.

Nachweisgrenze des Reverse-Phase-Assays

Um die Menge an F_c -Fragment und Immunoglobulin zu bestimmen, welche mit diesem Microarray-Format gerade noch detektiert werden kann ($SNR \geq 3$), wurde humanes F_c -Fragment in einem Konzentrationsbereich von 0,02 bis 20 μM (0,001 bis 2 mg/mL) und

¹⁴ Bestimmt mit ClustalW: <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

IgG 3 in einem Bereich von 0,01 bis 11,8 μM (0,001 bis 2 mg/mL) auf Nitrocelluloseslides gespottet und mit den fluoreszenzmarkierten Aptameren inkubiert.

Die Abbildung 2.47 zeigen die Abhängigkeit relativen Signalintensität (A) und der SNR (B) von der gespotteten Konzentration an F_c -Fragment. Die Nachweisgrenze (LOD) liegt bei 1 μM (0,05 mg/mL), bei geringeren Konzentrationen liegt die SNR unter 3.

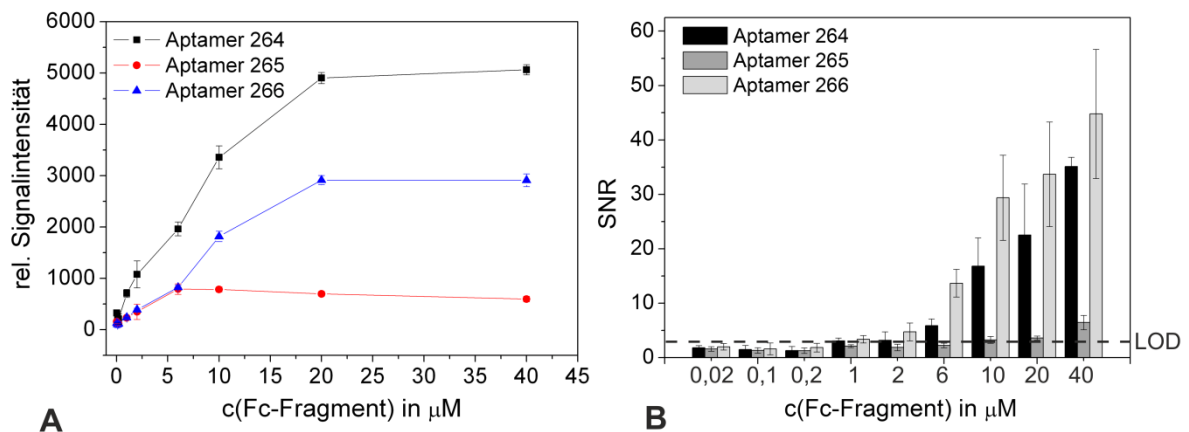


Abbildung 2.47 Bestimmung der Nachweisgrenze des *Reverse-Phase*-Assays für die Detektion von humanem F_c -Fragment mit den Cy3-markierten Aptameren 264, 265 und 266 auf Nitrocelluloseslides. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten (A) und die SNR (B) in Abhängigkeit von der Konzentration an immobilisiertem humanem F_c -Fragment. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 250).

Der Verlauf der relativen Signalintensität in Abbildung 2.47 A zeigt, dass sich der dynamische Bereich des *Reverse-Phase*-Microarrays für die Aptamere 264 und 266 bis zu einer Konzentration von 20 μM erstreckt. Im Falle des Aptamers 265 liegt eine Sättigung schon ab einer Konzentration des F_c -Fragments von 6 μM vor. Somit tritt schon bei kleinen Mengen an immobilisiertem Zielmolekül ein Bindungsgleichgewicht des Detektionsaptamers 265 auf. Die unterschiedlichen relativen Signalintensitäten könnten einerseits auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Aptamere zu dem immobilisierten F_c -Fragment zurück geführt werden. Es ist aber auch möglich, dass im Falle des Aptamers 265 das Fluorophor nach der Bindung verdeckt und somit schlechter für eine Detektion zugänglich ist. Ebenso könnten unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Aptamere zu unterschiedlichen Anteilen inkorrekt gefaltet sein, was eine Bindung an das Targetprotein erschwert. Um die erhaltenen Ergebnisse direkt auf die Bindungsaffinitäten der Aptamere zurückführen zu können, sind weitere Experimente nötig. Beispielsweise könnte die

Faltungproblematik durch eine Denaturierung und anschließende Faltung der Aptamere vor der Inkubation näher untersucht werden.

In den Abbildungen 2.48 sind die relativen Signalintensitäten und die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an gespottetem Immunglobulin 3 dargestellt. Die Nachweisgrenze für IgG3 liegt für das 264 und 265 Aptamer bei 0,29 μM (0,05 mg/mL) und für das 266-Aptamer bei sogar nur 0,06 μM (0,01 mg/mL).

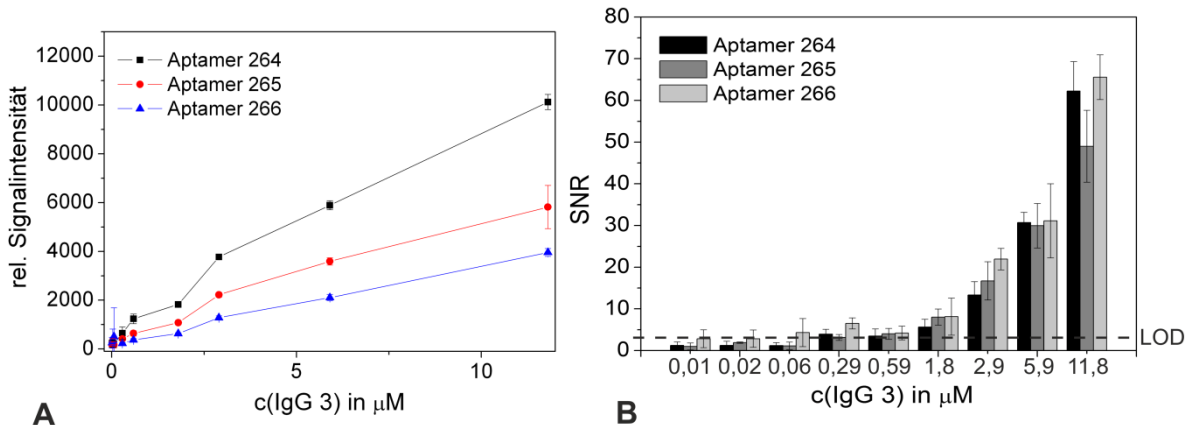


Abbildung 2.48 Bestimmung der Nachweisgrenze des *Reverse-Phase*-Assays für die Detektion von IgG3 mit den Cy3-markierten Aptameren 264, 265 und 266 auf Nitrocelluloseslides. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten (A) und die SNR (B) in Abhängigkeit von der Konzentration an immobilisiertem IgG3. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 250).

Die Ergebnisse in Abbildung 2.48 A zeigen für die drei Aptamere einen proportionalen Anstieg der relativen Signalintensität, welcher nicht in die Sättigung geht. Somit könnte die Konzentration an immobilisiertem Immunglobulin noch gesteigert werden, um eine Sättigung zu erhalten. Obwohl das Aptamer 266 die geringsten Signalintensitäten aufweist, zeigt es bei niedrigen Konzentrationen an IgG3 die höchsten SNR-Werte. Dieses Aptamer bindet nur wenig an den Hintergrund, was sich positiv auf die Nachweisgrenze des Assays auswirkt. Wie bei der Detektion von IgG1 können die unterschiedlichen Signalintensitäten nicht ohne weiteres auf die Bindungsaffinitäten der Aptamere zurückgeführt werden.

Antikörper und Aptamere im Vergleich

In Abschnitt 2.4.1.3 konnte bereits gezeigt werden, dass der entwickelte aptamerbasierte *Reverse-Phase*-Assay zur Detektion von His-getaggtten Proteinen eine vielversprechende Alternative zu dem parallel durchgeführten Antikörper-Assay darstellt.

Dies soll desweiteren auch für die Detektion von Immunoglobulinen untersucht werden. Hierfür wurden auf Nitrocelluloseslides humanes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und polyklonales humanes IgG sowie humanes F_c-Fragment und polyklonales Maus-IgG in einer Konzentration von 1 mg/mL immobilisiert. Als Negativkontrollen wurden zusätzlich FCS, BSA und PFEI-his gespottet. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde der Versuch auf 16-Pad-Nitrocelluloseslides durchgeführt. Jedes der Microarray-Pads, auf welchen die zehn Proteine mit neun Replikaten vorliegen, wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers anti Human-IgG-Cy3 und des Aptamers 264-Cy3 inkubiert. Die Abbildung 2.49 zeigt die Scans der Pads, welche jeweils die besten Ergebnisse lieferten.

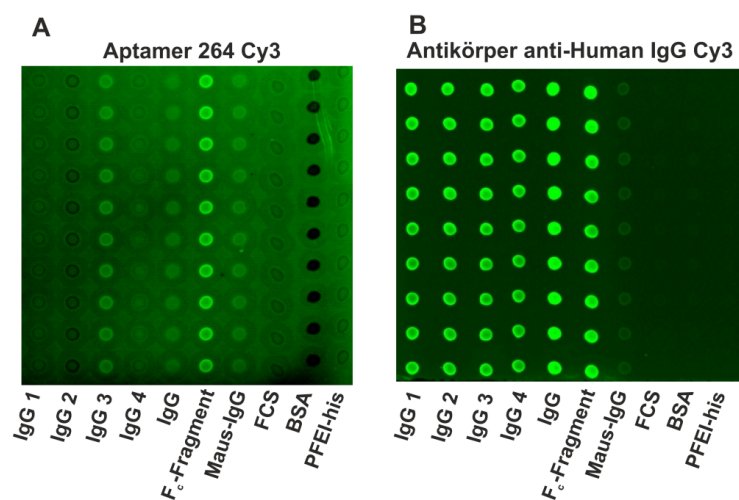


Abbildung 2.49 Vergleich der Detektion verschiedenener Immunoglobuline im *Reverse-Phase*-Format mit Detektionsantikörper und -aptamer. Dargestellt sind die Scans der Nitrocellulosepads, inkubiert mit (A) 35 nM Antikörper bzw. (B) 1000 nM Aptamer 264 (PMT-Gain: 250).

Die beiden Scans zeigen bereits einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Bindungsaffinität und -spezifität der Detektionsmoleküle. Der Antikörper bindet mit hoher Quantität an alle humanen IgGs einschließlich humanem F_c-Fragment. An das Maus-IgG bindet der Antikörper nur geringfügig. Für das Aptamer 264 ergeben sich für die verschiedenen Proteine unterschiedliche Signalintensitäten. In erster Linie werden das IgG3 und das humane F_c-Fragment gebunden.

Die Abbildung 2.50 zeigt die SNR-Werte der beiden Assays für die verschiedenen immobilisierten Proteine. Während der antikörperbasierte *Reverse-Phase*-Assay SNR-Werte im Bereich von 100 bis 500 aufweist, ergeben sich mit dem Aptamer 264 auf dem Nitrocellulose-Pad nur Werte von 10 bis 40. Dies ist auf die insgesamt geringere relative

Signalintensität bei Verwendung des Aptamers 264-Cy3 zurückzuführen. Vermutlich muss im 16-Pad-Format aufgrund der geringeren Inkubationsvolumina mit höheren Aptamerkonzentrationen gearbeitet werden als im Single-Pad-Format (siehe Abschnitt 2.4.1.3).

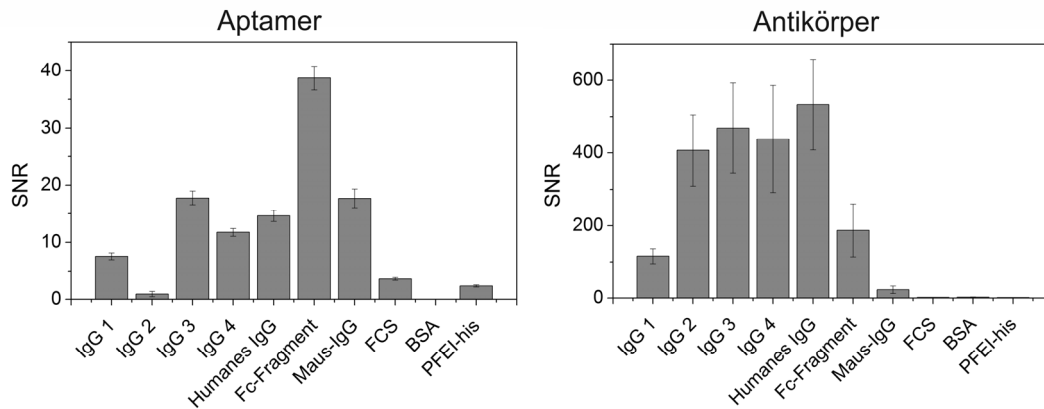


Abbildung 2.50 Vergleich der Detektion verschiedener Immunoglobuline im *Reverse-Phase*-Format mit Detektionsaptamer und -antikörper. Dargestellt sind die SNR-Werte der Detektion der immobilisierten Proteine mit (A) Aptamer und (B) Antikörper (PMT-Gain: 250).

Auffällig ist insbesondere die Möglichkeit eine ausreichende Detektion mit sehr geringen Mengen an Detektionsantikörper zu erreichen. Der in Abbildung 2.49 B gezeigte Scan basiert auf einer Inkubation mit nur 35 nM Antikörper, während das Aptamer in einer Konzentration von über 800 nM eingesetzt wurde. Eine mögliche Erklärung für die höheren Signalintensitäten bei Verwendung des Antikörpers liegt in der höheren Markierungseffizienz (D/P-Ratio) des Antikörpers. Nach einer Untersuchung der beiden Detektionsmoleküle im Nano-Drop ND-1000 konnten das ungefähre Verhältnis von Cy3-Farbstoff zu Antikörper bzw. Aptamer bestimmt werden. Es ergab sich für den verwendeten Antikörper eine Menge an 2,6 Cy3-Moleküle pro Antikörper, während pro Aptamer nur 0,8 Cy3-Moleküle vorliegen. Neben der erhöhten Markierungseffizienz ist sicherlich ein weiterer Grund, dass der polyklonale Detektionsantikörper an verschiedenste Stellen der IgGs binden kann, während das Aptamer vermutlich nur einen Sequenzabschnitt erkennt und spezifisch bindet und somit monoklonale Eigenschaften aufweist.

Dieser Versuch zeigt, dass der Einsatz von polyklonalen Antikörpern zur Detektion immobilisierter Immunoglobuline geeigneter ist als „monoklonale“ Aptamere. Es konnten weitaus höhere Signalintensitäten und SNR-Werte bei geringerer Menge an Detektionsmoleküle erzielt werden. Aufgrund der Eigenschaft von polyklonalen Antikörpern

verschiedenste Stellen ihres Zielmoleküls zu erkennen und binden, können sie jedoch kaum zwischen ähnlichen Strukturen unterscheiden. Alle IgG-Formen wurden ähnlich stark gebunden. Die Detektion mit dem Aptamer hingegen zeigt eine deutliche Diskriminierung zwischen einzelnen IgG-Subtypen.

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt bestätigten die Anwendbarkeit der anti F_c-Aptamere als Detektionsmoleküle auf *Reverse-Phase*-Microarrays. Auf Nitrocelluloseslides konnten dabei mit hoher Spezifität Nachweisgrenzen im mikromolaren Bereich erzielt werden.

2.4.2.3 Sandwich-Assay

Im Sandwich-Format wird sowohl ein Fängermolekül als auch ein Detektionsmolekül eingesetzt. Trotz des höheren Arbeitsaufwands, sowohl in der Entwicklungsphase, als auch in der praktischen Anwendung, birgt dieses Format viele Vorteile, u.a. die Möglichkeit der markierungsfreien Proteindetektion. Im Gegensatz zum *Reverse-Phase*-Microarray liegt hier bei der Vermessung komplexer Proben keine Limitierung durch die Bindungskapazität der Oberfläche vor. Desweiteren kann durch den Einsatz von zwei spezifisch bindenden Molekülen die Sensitivität sowie Spezifität des Assays erheblich gesteigert werden.

Bei der Wahl geeigneter Fänger- und Detektionsmoleküle sollte darauf geachtet werden, dass diese an unterschiedliche Epitope des Target-Proteins binden, um eine simultane Bindung an zwei verschiedene Bereiche zu gewährleisten. Im Falle der Aptamere gegen humanes F_c-Fragment ist diese Voraussetzung aufgrund der dimeren Struktur des F_c-Fragments von vornherein gewährleistet.

Basierend auf dem optimierten *Forward-Phase*-Microarray (siehe Abschnitt 2.4.2.1) wurden die drei Aptamere 264, 265 und 266 auf PEI-Aldehydslides immobilisiert und mit dem Zielprotein humanes F_c-Fragment in verschiedenen Konzentrationen (0-200 nM) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgt anschließend die Inkubation mit Cy3-markiertem Aptamer für zwei Stunden. Die „*Detectamere*“ wurden in einer Konzentration von 15 µg/mL eingesetzt, was sich bereits im *Reverse-Phase*-Assay als optimal herausstellte (siehe Abschnitt 2.4.2.2). Zur Entwicklung dieses Assays wurden verschiedene Optimierungen hinsichtlich der verwendeten Kombination an Aptameren sowie der Inkubations- und Waschzeiten durchgeführt, was im Folgenden detailliert beschrieben wird. Um stets sicherzustellen, dass die immobilisierten Aptamere eine ausreichende Funktionalität

aufweisen, wurde für jede Versuchsreihe mit einem der bedruckten Microarrays eine Detektion von Cy3-markiertem F_c-Fragment als Positivkontrolle parallel durchgeführt.

Ermittlung der optimalen Aptamerkombination

Bei der Entwicklung eines aptamerbasierten Sandwich-Assays spielt die Wahl des Fänger- und Detektionsmoleküls eine entscheidende Rolle. Beide Aptamere müssen das Targetprotein in ausreichender Quantität erkennen und binden können. Desweiteren sollten die Wechselwirkungen zwischen den beiden Aptameren möglichst gering sein, um unspezifische Bindungen zu minimieren.

Zunächst wurden die Microarrays, auf welchen die drei Aptamere als Fängermoleküle immobilisiert waren, mit humanem F_c-Fragment in einer Konzentration von 5 µg/mL inkubiert, sowie nur mit Bindungspuffer als Negativkontrolle. Anschließend fand die Inkubation mit den drei fluoreszenzmarkierten Aptameren 264, 265 und 266 statt. Optimal ist ein möglichst kleines Signal bei Verwendung des Puffers, so kann von einer minimalen Wechselwirkung der Aptamere untereinander ausgegangen werden. Anhand der Differenz der Werte kann eine Aussage über die Eignung der verschiedenen Aptamerkombinationen für den Sandwich-Assay erfolgen. Die Abbildung 2.51 zeigt die SNR-Werte der Microarrays.

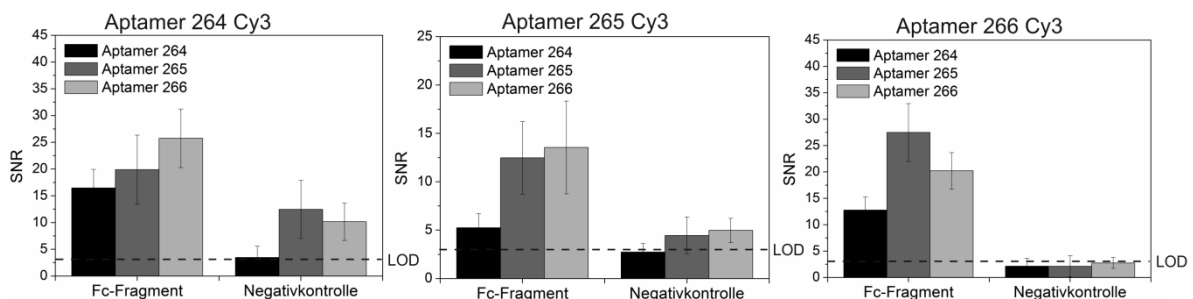


Abbildung 2.51 Bestimmung der optimalen Kombination der Fängeraptamere sowie Detektionsaptamere im Sandwich-Format. Gezeigt sind die SNR-Werte für die Detektion von humanem F_c-Fragment bzw. der Negativkontrolle mit den drei Cy3-markierten Aptameren 264, 265 und 266 (je 15 µg/mL) in Abhängigkeit von dem immobilisierten Fängeraptamer auf PEI-Aldehydslides (PMT-Gain: 600).

Es ist eindeutig zu erkennen, dass das Aptamer 266-Cy3 die geringsten Wechselwirkungen mit den drei immobilisierten Aptamersequenzen eingeht, die SNR-Werte liegen zwischen 2 und 3 für die Negativkontrolle. Die Verwendung des Aptamers 264 und 265 als „Detectamere“ lieferte zum Teil SNR-Werte größer als 3 für die Negativkontrollen.

Somit sind drei Kombinationen (264/266-Cy3, 265/266-Cy3 und 266/266-Cy3) für den Aufbau eines Sandwich-Assays geeignet. Die Kombination Aptamer 265 als Fänger- und Aptamer 266 als Detektionsmolekül ist bezüglich dieser ersten Ergebnisse am besten.

Für die weiteren Experimente wurde ausschließlich das Aptamer 266-Cy3 als „Detectamer“ eingesetzt. Da dieses Aptamer in allen Fällen nur wenige Wechselwirkungen mit den immobilisierten Aptamern eingeht, wurden weiterhin alle drei Aptamere als „Captamere“ eingesetzt.

Optimierung der Inkubationszeit

Um den Einfluss der Inkubationszeit des Targetproteins auf die erhaltene relative Signalintensität zu untersuchen, wurde der Sandwich-Assay mit dem 266-Cy3 Aptamer zur Detektion des F_c-Fragments unter Verwendung von Inkubationszeiten von 30 min bis 4 h wiederholt.

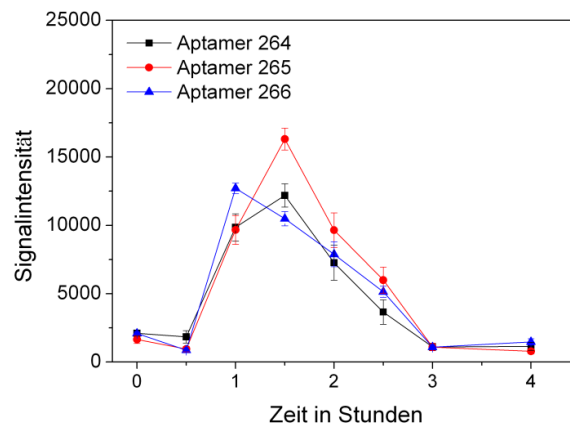


Abbildung 2.52 Einfluss der Inkubationszeit des humanen F_c-Fragments von der Signalintensität im Sandwich-Format. Die Aptamere 264, 265 und 266 wurden in einer Konzentration von 100 μM immobilisiert. Das F_c-Fragment wurde jeweils in einer Konzentration von 10 μg/mL eingesetzt, die Detektion erfolgte mit Cy3-markiertem Aptamer 266 (15 μg/mL (PMT-Gain: 700)).

Die in Abbildung 2.52 dargestellte Bindungskinetik zeigt für Aptamer 264 und 265 eine maximale Signalintensität bei einer Inkubationszeit von 1,5 h, für Aptamer 266 bei 1 h. Werden die Slides länger mit dem Targetprotein inkubiert so sinkt die Signalintensität rapide. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis ist, dass bei langen Inkubationszeiten zu viele F_c-Fragmente an die immobilisierten Aptamere binden und somit die Bindungsstellen für die nachfolgende Detektion sterisch blockiert werden. Diese Abnahme der Signalintensität mit steigender Inkubationszeit des Zielmoleküls wurde bereits von Edwards *et al.* (2010) [105]

beobachtet. Hier wurde ein aptamerbasierter Sandwich-Assay zum Nachweis von Thrombin entwickelt. Die erhaltene Signalintensität sank bereits nach Inkubationszeiten von 1 h rapide, wobei die Abnahme bei höheren Thrombinkonzentrationen stärker auftrat. Edwards *et al.* (2010) begründen diese Beobachtung mit einer zunehmenden sterischen Hinderung der Detektamerbindung bei zu hoher Targetkonzentration.

Um zu überprüfen was letztendlich der Auslöser für die Abnahme der Signalintensität mit der Inkubationszeit im Sandwich-Format ist, sollte im *Forward-Phase-Format* ebenfalls die Abhängigkeit der Inkubationszeit von der Bindung untersucht werden.

Festzuhalten bleibt, dass die Inkubationszeit je nach Zielmolekül für jeden aptamerbasierten Sandwich-Assay gesondert untersucht werden muss. Für die anti F_c-Aptamere stellte sich in diesem Experiment eine Inkubationszeit von 1,5 h als optimal heraus, welche in den weiteren Experimenten verwendet wurde.

Detektion von humanem F_c-Fragment im Sandwich-Format

Nach erfolgreicher Optimierung des Assays wurde der Sandwich-Microarray hinsichtlich der Spezifität und Nachweisgrenze für humanes F_c-Fragment untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität wurde der Microarray mit BSA in einer Konzentration von 10 µg/mL inkubiert. Die Abbildung 2.53 stellt die Ergebnisse im Vergleich mit der Inkubation von reinem F_c-Fragment sowie der Negativkontrolle (je 10 µg/mL) dar.

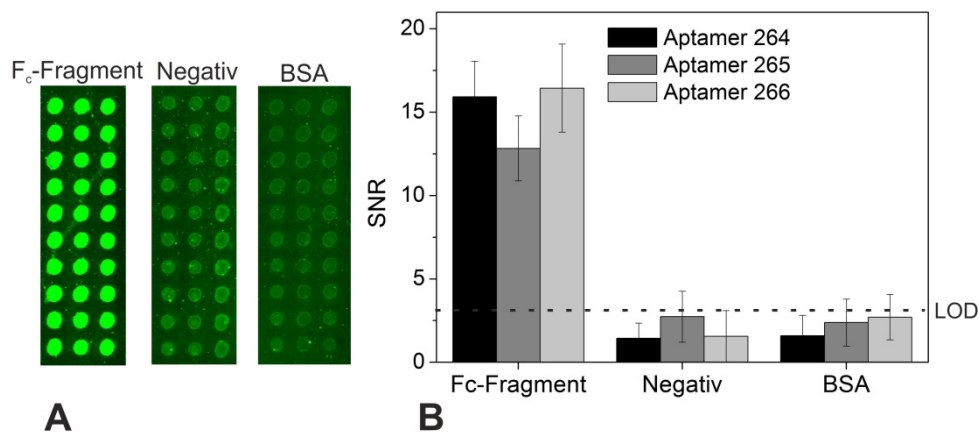


Abbildung 2.53 Untersuchung der Spezifität des Sandwich-Formats zur Detektion von humanem F_c-Fragment. Die Microarrays wurden mit humanem F_c-Fragment (10 µg/mL), Negativkontrolle (Bindungspuffer) und BSA (10 µg/mL) inkubiert, die Detektion erfolgte mit Cy3-markiertem Aptamer 266 (15 µg/mL). (A) Scans der Sandwich-Microarrays. (B) SNR-Werte in Abhängigkeit von den immobilisierten Aptameren 264, 265 und 266 (100 µM). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 600).

Während die SNR bei der Detektion von humanem F_c-Fragment in diesem Sandwich-Assay für alle drei Aptamere im Bereich von 12 bis 17 liegt, zeigt die Negativkontrolle sehr schwache Signale mit SNR-Werten kleiner als 3. Bei Verwendung des BSA zur Inkubation wurde ebenfalls keine bzw. nur eine sehr schwache Bindung erhalten. Dieses Ergebnis bestätigt die potentielle Anwendbarkeit dieses aptamerbasierten Sandwich-Assays für die Detektion von humanem F_c-Fragment.

In einem nächsten Schritt wurde die Nachweisgrenze des Assays bestimmt. Hierzu wurden die drei Aptamere 264, 265 und 266 auf PEI-Aldehydslides immobilisiert und jeweils mit Konzentrationen an humanem F_c-Fragment im Bereich von 0 bis 200 nM (0 bis 10 µg/mL) inkubiert. In der Abbildung 2.54 sind die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des Zielmoleküls dargestellt. Die Nachweisgrenze des entwickelten Sandwich-Assays zur Detektion von F_c-Fragment beträgt nur 2 nM. Die Negativkontrolle ebenfalls ein schwaches Signal, was jedoch unterhalb der SNR von 3 liegt.

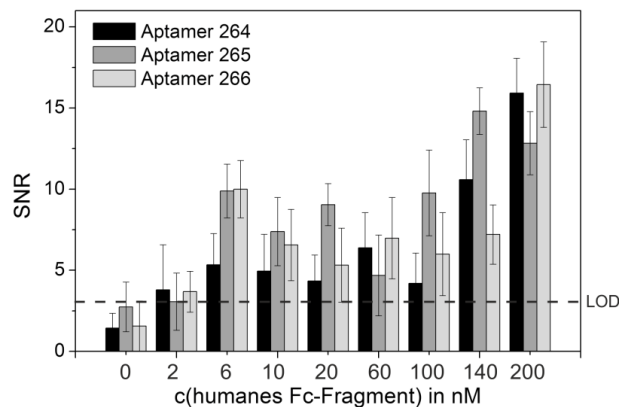


Abbildung 2.54 Bestimmung der Nachweisgrenze des Sandwich-Assays für die Detektion von humanem F_c-Fragment. Dargestellt sind die SNR-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetztem F_c-Fragment und für die drei immobilisierten Aptamere (264, 265 und 266, je 100 µM) nach Detektion mit Cy3-markiertem Aptamer 266 (15 µg/mL). Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze (LOD) dar (PMT-Gain: 600).

Auf Basis des Cy3-markierten Aptamers 266 als „*Detectamer*“ konnte ein Sandwich-Assay zur Detektion von humanen Fc-Fragment auf PEI-Aldehyd-Oberflächen entwickelt werden. Mit hoher Spezifität bezüglich der hier eingesetzten Negativkontrolle BSA wurde das Zielprotein bis zu einer minimalen Konzentration von 2 nM nachgewiesen.

2.4.2.4 Zusammenfassung: Detektion von Immunglobulinen

Die Detektion von humanem F_c-Fragment konnte mit den drei Assays, *Forward-Phase*, *Reverse-Phase* und Sandwich, erfolgreich realisiert werden. Die Tabelle 2.9 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Neben der besten Oberfläche und dem geeignetsten Aptamer sind jeweils auch die Nachweisgrenze (LOD) und die Spezifität der Assays aufgeführt. Im *Forward*- und *Reverse-Phase*-Assay zeigte die Anwendung der PEI-modifizierten Aldehyd- bzw. Nitrocelluloseslides die besten Bindungserfolge. Desweiteren führte in beiden Fällen das Aptamer 264 zu den stärksten Signalen.

Tabelle 2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Detektion von Immunglobulinen auf aptamerbasierten Microarrays in den drei entwickelten Formaten.

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Sandwich
Oberfläche	PEI-Aldehyd	Nitrocellulose	PEI-Aldehyd
Aptamer	264	264-Cy3, 266-Cy3	265/266-Cy3 266/266-Cy3
LOD	1 nM (F _c)	1000 nM (F _c) 60 nM (IgG 3)	2 nM (F _c)
Spezifität	gruppenspezifisch keine Bindung von BSA, PFEI-his	gruppenspezifisch keine Bindung von FCS, BSA, PFEI-his	keine Bindung von BSA

Die Nachweisgrenzen der drei Microarray-Formate unterscheiden sich erheblich. Während im *Forward-Phase*-Format das F_c-Fragment noch in einer Konzentration von 1 nM nachgewiesen werden konnte, liegt die LOD im *Reverse-Phase*-Format bei 1 µM. Dies ist auf den limitierenden Faktor der Oberflächenbindung zurückzuführen, sowie auf den limitierenden Effekt der elektrostatischen Abstoßung des Detektionsaptamers von der Nitrocellulosemembran. Die Immobilisierung der Proteine kann zudem zu einer ungünstigen Ausrichtung der Proteine führen, was die Erkennung und Bindung der Aptamere erschwert. Hinsichtlich der Spezifität der verwendeten Aptamere konnte eine ausgeprägte Gruppenspezifität nachgewiesen werden, was eine breite Einsetzbarkeit der hier entwickelten Methoden ermöglicht.

Um eine markierungsfreie Detektion der Proteine ohne Immobilisierung zu realisieren, wurde ein aptamerbasierter Sandwich-Assay entwickelt. Ein Screening mit verschiedenen Aptamer-

Kombinationen zeigte, dass das Aptamer 266 am besten als „*Detectamer*“ geeignet ist. Für die Detektion von humanem F_c-Fragment konnte eine LOD von 2 bis 6 nM erzielt werden. Dieses Format ist also über 100-fach sensitiver als der *Reverse-Phase*-Microarray. Durch weitere Optimierungen könnten die Aptamerwechselwirkungen minimiert werden. Hierfür wären härtere Waschbedingungen oder zusätzliche Schritte zur Blockierung der freien Aptamere denkbar.

Zusammengefasst stellt der Sandwich-Assay eine weitere interessante Möglichkeit der aptamerbasierten Proteindetektion dar.

2.4.3 Detektion von VEGF₁₆₅

Neben der Detektion von His-getaggten Proteinen und Antikörpern wurde in dieser Arbeit ein aptamerbasierter Microarray zur Detektion von humanem VEGF₁₆₅ entwickelt. Hierfür wurden zwei verschiedene Aptamere V7t1 und del5_1 (siehe Abschnitt 2.1) eingesetzt.

Zunächst wurden die Bindungseigenschaften sowie die Spezifitäten der Aptamere im *Reverse-Phase*-Format untersucht und die beiden Aptamere miteinander verglichen. Alle Versuche wurden ausschließlich auf 16-Pad-Nitrocelluloseslides (SCHOTT) durchgeführt. Die optimierten Protokolle zur Detektion von VEGF₁₆₅ mit aptamerbasierten Microarrays sind im Anhang zu finden.

2.4.3.1 *Reverse-Phase*-Assay

Der *Reverse-Phase*-Assay wurde analog zu den bereits entwickelten Protokollen zur Detektion von His-getaggten Proteinen sowie Immunoglobulinen durchgeführt. Zur Inkubation und Waschen der Microarrays wurde der Selektionspuffer der VEGF-Aptamere verwendet. Hinsichtlich der Position der Fluoreszenzmarkierung sowie der Aptamerkonzentration und Nachweisgrenzen wurde eine Optimierung vorgenommen. In einem weiteren Abschnitt werden die unternommenen Protokolloptimierungen dargestellt und diskutiert.

Mithilfe diesen Assays wurde analog zu den anti His-Tag- (siehe Abschnitt 2.4.1.3) und anti F_c-Aptameren (siehe Abschnitt 2.4.2.2) der Nachweis von VEGF₁₆₅ in *E. coli*-Zelllysaten durchgeführt.

Optimale Aptamerkonzentration

Zur Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration der beiden Aptamere wurde kommerziell erhältliches VEGF₁₆₅ (Dianova) in einer Konzentration von 0,5 mg/mL immobilisiert und anschließend mit verschiedenen Aptamerkonzentrationen von 10 nM bis 1400 nM inkubiert. Es wurden nur die Aptamere verwendet, welche am 5'-Ende Cy3-markiert sind. Anhand der höchsten SNR-Werte wurde die optimale Aptamerkonzentration bestimmt. Für das Aptamer V7t1 ergab sich eine Konzentration von 100 nM und für das Aptamer del5_1 eine Konzentration von 1000 nM (Daten nicht gezeigt).

Einfluss der Position des Fluorophors

Bereits in Abschnitt 2.4.2.3 konnte für die Detektion von PFEI-his im *Reverse-Phase*-Format ein Einfluss der Signalintensität von der Position des Fluorophors am Aptamer festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde dieser Effekt auch für die Detektion von VEGF₁₆₅ untersucht. Hierfür wurden die beiden Aptamere V7t1 und del5_1 jeweils in zwei Varianten als Detektionsmoleküle verwendet: mit Cy3-Markierung am 3'- und am 5'-Ende des Oligonukleotids. Das Targetprotein VEGF₁₆₅ wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/mL auf die Nitrocellulosepads gespottet und anschließend mit den Aptameren inkubiert. Die Aptamere wurden in ihren optimalen Konzentrationen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.55 dargestellt.

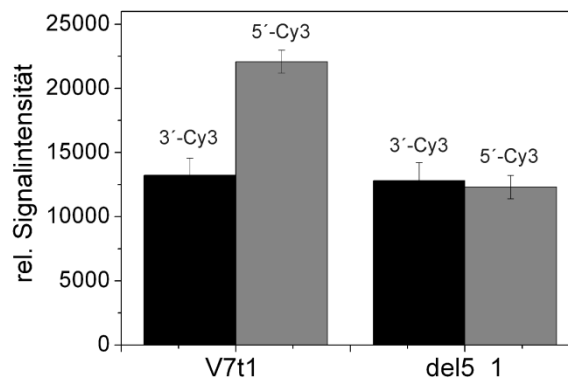


Abbildung 2.55 Einfluss der Position des Cy3 an den Aptameren V7t1 (100 nM) und del5_1 (1000 nM) auf die Targetbindung (VEGF₁₆₅: 0,5 mg/mL) im *Reverse-Phase*-Format auf Nitrocelluloseslides. Aufgetragen sind die relativen Signalintensitäten (PMT-Gain: 300).

Bei Verwendung des Aptamer V7t1, welches am 5'-Ende Cy3-markiert ist, werden höhere relative Signalintensitäten erhalten als mit dem 3'-Cy3-V7t1. Eine Ursache für die geringere Signalintensität im Falle des 3'-markierten V7t1 kann einerseits in einer sterischen Hinderung

der Targetbindung aber auch in einer Verdeckung des Fluorophors nach Bindung an das immobilisierte VEGF₁₆₅ liegen. Für das Aptamer del5_1 werden mit der Cy3-Markierung am 3'-Ende ähnliche Signalintensitäten wie bei Verwendung des 5'-markierten Aptamers erhalten. Im Falle des del5_1 kann durch Variation der Position des Fluorophors somit keine Verbesserung der Signalintensität erzielt werden. Möglicherweise sind beide Enden des Oligonukleotidstrangs des Aptamers del5_1 nicht maßgeblich, oder in gleichem Maße an der Bindung des VEGF beteiligt.

In allen weiteren Abschnitten werden nur die Ergebnisse der *Reverse-Phase*-Microarrays präsentiert, welche mit den Detektionsaptameren 5'-Cy3-V7t1 und 3'-Cy3-del5_1 durchgeführt wurden.

Vergleich der Aptamere

Für den direkten Vergleich der Aptamere sind in Abbildung 2.56 die relativen Signalintensitäten für die Detektion von VEGF₁₆₅ (0,2 mg/mL) auf Nitrocelluloseslides in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration aufgetragen.

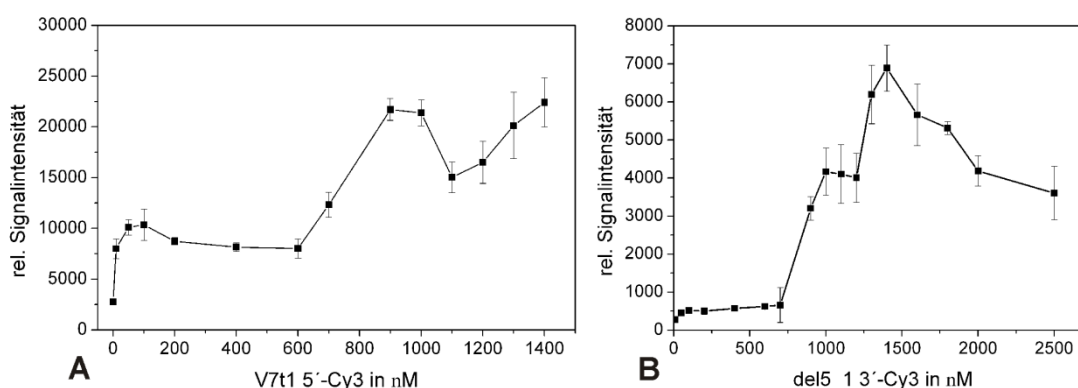


Abbildung 2.56 Abhängigkeit der relativen Signalintensität von der Konzentration des Detektionsaptamers V7t1 (5'-Cy3) und del5_1 (3'-Cy3) für die Detektion von VEGF₁₆₅ (0,2 mg/mL) im *Reverse-Phase*-Format auf Nitrocelluloseslides (PMT-Gain: 200).

Während bei Verwendung des Aptamers V7t1 in diesem Experiment relative Signalintensitäten von über 20.000 erzielt wurden, sind mit dem Aptamer del5_1 maximale Werte von nur 7.000 erreichbar. Zudem steigt die Signalintensität im Falle des V7t1 schon bei sehr kleinen Aptamerkonzentrationen von 50 nM auf sehr hohe Signalintensitäten (10.000) an (Abbildung 2.56 A). Für das del5_1 Aptamer sind Konzentrationen im Bereich ab 800 nM für Signalintensitäten über 1000 nötig (Abbildung 2.56 B). Die Begründung dieser Beobachtungen liegt in den unterschiedlichen Affinitäten der beiden Aptamere. Laut Nonaka

et al. (2010) sowie Hasegawa *et al.* (2008) betragen die Dissoziationskonstanten (K_D) 1,4 nM für V7t1 [34] und 476,2 nM für del5_1 [64]. Diese Werte korrelieren mit den Ergebnissen des *Reverse-Phase*-Formats. Aufgrund der hohen Affinität des Aptamers V7t1 sind für eine Detektion von VEGF₁₆₅ weniger Moleküle nötig als im Falle des weniger affinen Aptamers del5_1.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde VEGF₁₆₅ in verschiedenen Konzentrationen: 0,5; 0,2; 0,1; 0,08; 0,05; 0,01 und 0,008 mg/mL auf Nitrocelluloseslides gespottet. Zusätzlich wurde als Negativkontrollen BSA, FCS und PFEI-his in einer Konzentration von 1 mg/mL immobilisiert (Abbildung 2.57 A und B). Bei Betrachtung der SNR-Werte in Abbildung 2.57 B sind auch hier insgesamt höhere Werte für das Aptamer V7t1 zu erkennen. Die Nachweisgrenze der beiden *Reverse-Phase*-Assays liegen jedoch bei demselben Wert von 0,01 mg/mL (217, 39 nM) VEGF. Bezüglich der Spezifität bindet das Aptamer V7t1 an das Protein PFEI-his stärker als del5_1. Im Falle der Negativkontrollen BSA und FCS gehen beide Aptamere keine unspezifischen Bindungen ein.

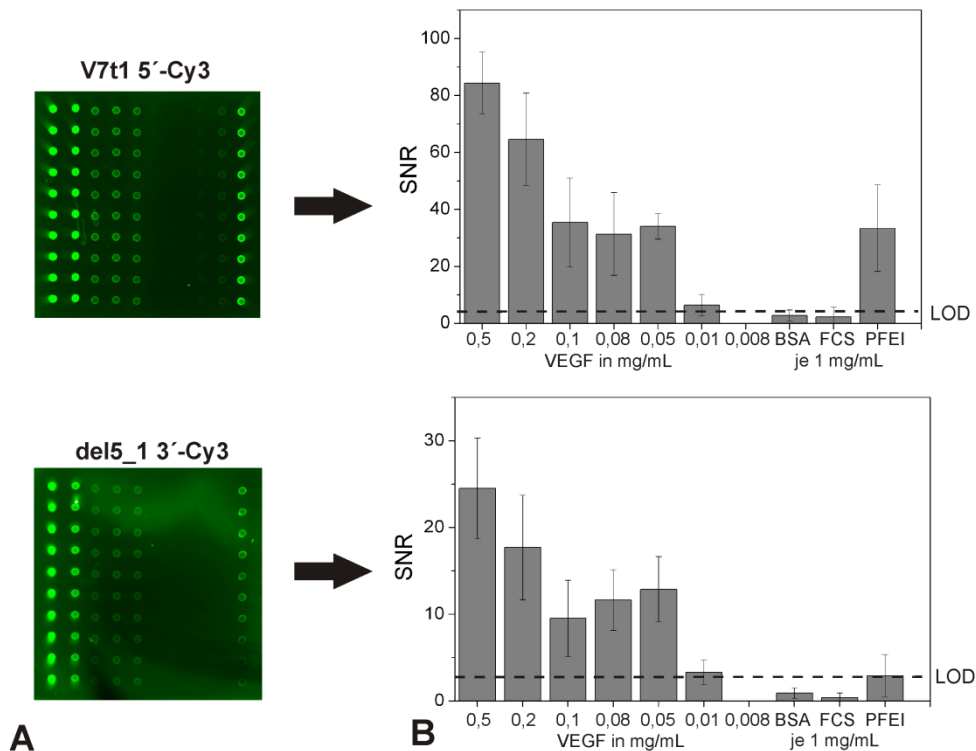


Abbildung 2.57 Bestimmung der Nachweisgrenze des *Reverse-Phase*-Assays für die Detektion von VEGF. Gezeigt sind die Scans (A) und die SNR-Werte (B) in Abhängigkeit von der Konzentration des VEGF₁₆₅ und der Negativkontrollen (BSA, FCS, PFEI-his) auf Nitrocelluloseslides nach Inkubation mit 5'-Cy3-markiertem V7t1 (100 nM) bzw. 3'-Cy3-markiertem del5_1 (1000 nM) Aptamer (PMT-Gain: 250).

Die in dieser Arbeit getesteten Aptamere können beide für die Detektion von VEGF₁₆₅ im *Reverse-Phase*-Format eingesetzt werden. Der Vorteil des V7t1 Aptamers liegt in der höheren Affinität. Durch den Einsatz geringerer Aptamer Mengen wird die Detektion kostengünstiger. Wird jedoch das weniger affine Aptamer del5_1 in ausreichend hohen Konzentrationen eingesetzt, so werden die gleichen Nachweisgrenzen wie mit dem Aptamer V7t1 erreicht (Abbildung 2.57 B).

Optimierung des Assays

Zur Verbesserung des verwendeten *Reverse-Phase*-Protokolls für die Detektion von VEGF₁₆₅ wurde zunächst der Einfluss von Kaliumchlorid auf die Targetbindung untersucht. Nonaka *et al.* (2010) zeigten bereits mithilfe von SPR-Messungen für das Aptamer Vap7, aus welchem das hier verwendete V7t1 durch Entfernung der Primerstellen entstand, dass die Anwesenheit von Kaliumionen (50 mM im Bindungspuffer) die Affinität des Aptamers zum immobilisiertem VEGF₁₆₅ erhöht [34]. Bereits in Abschnitt 2.1.3 wurden die möglichen Strukturen des Aptamers V7t1 vorgestellt. Da die G-Quadruplexstruktur von einwertigen Kationen, wie Kalium, stabilisiert wird, spielt sie bei der Targetbindung vermutlich eine entscheidene Rolle. Um zu überprüfen, ob sich die Signalintensitäten sowie SNR-Werte für die Detektion von VEGF₁₆₅ im Microarray-Format ebenfalls durch Kaliumionen steigern lassen, wurde VEGF auf Nitrocellulose (16-Pad) immobilisiert. Die Inkubation der einzelnen Pads fand anschließend mit dem 5'-Cy3-markiertem V7t1 (100 nM) in verschiedenen Bindungspuffern statt: TBSTE (ohne KCl), TBSTE-50 (50 mM KCl) und TBSTE-100 (100 mM KCl). Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 2.58 dargestellt.

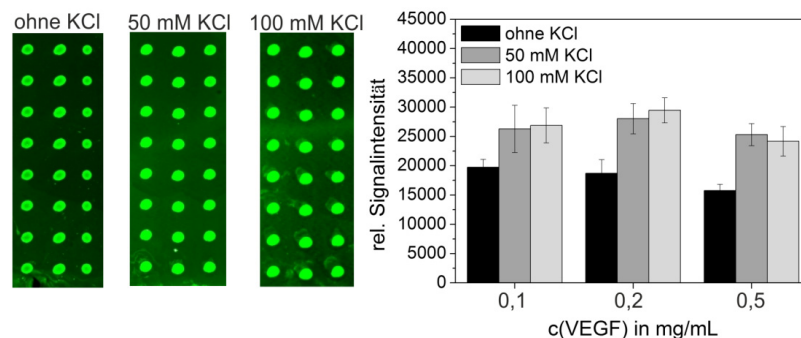


Abbildung 2.58 Einfluss von Kaliumionen im Bindungspuffer auf die Detektion von VEGF₁₆₅ mit dem Aptamer 5'-Cy3-V7t1 im *Reverse-Phase*-Format auf Nitrocelluloseslides. Abgebildet sind die Scans sowie die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Konzentration an immobilisiertem VEGF₁₆₅ (PMT-Gain: 250).

Bei Verwendung von 50 mM bzw. 100 mM Kaliumchlorid im Bindungspuffer konnten die Signalintensitäten für die Detektion von VEGF₁₆₅ deutlich gesteigert werden. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass das Aptamer V7t1 in einer G-Quadruplexstruktur vorliegt [34], welche von monovalenten Kationen stabilisiert wird.

Neben dem Einfluss von Kaliumionen auf die Bindung des VEGF wurde ebenfalls getestet, inwiefern eine Denaturierung und Faltung des Detektionsaptamers 5'-Cy3-V7t1 Einfluss auf die korrekte Faltung des Aptamers und somit die erhaltene relative Signalintensität hat. Das Aptamer wurde hierfür in dem Bindungspuffer TBST verdünnt und für fünf min bei 95 °C inkubiert. Die Faltung fand anschließend durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur statt.

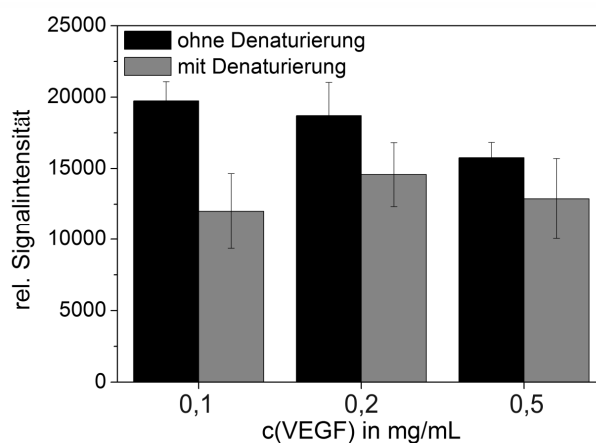


Abbildung 2.59 Einfluss der Denaturierung und Faltung des Aptamer V7t1 vor der Inkubation mit dem Nitrocelluloseslide von der Targetbindung im *Reverse-Phase*-Format. Dargestellt sind die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Konzentration an immobilisiertem VEGF₁₆₅ (PMT-Gain: 250).

Die Ergebnisse in Abbildung 2.59 zeigen, dass durch die Denaturierung und Faltung vor Durchführung des Experiments keine Verbesserung der relativen Signalintensität erzielt werden konnte, die Intensitäten waren sogar etwas niedriger.

Eine Verbesserung der Targetbindung im *Reverse-Phase*-Format bei Verwendung des Detektionsaptamers 5'-Cy3-V7t1 konnte insgesamt gesehen nur durch den Zusatz von Kaliumionen im Bindungspuffer erzielt werden. Diese monovalenten Ionen unterstützen vermutlich die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur (G-Quadruplex) des Aptamers. Es konnte gezeigt werden, dass bereits mit einer Konzentration von 50 mM Kaliumchlorid im Bindungspuffer eine Erhöhung der Signalintensität erzielt werden kann.

Noch höhere Konzentrationen liefern keine weitere Verbesserungen. Die Einführung eines zusätzlichen Denaturierungsschrittes hingegen führt hier zu keiner höheren Signalintensität. Beide Optimierungsansätzen haben keine Auswirkung auf die Spezifität des Aptamers (Daten nicht gezeigt).

Detektion aus Zelllysate

Da keine unspezifischen Bindungen der beiden Aptamere gegenüber BSA und fetalem Kälberserum im *Reverse-Phase*-Format erhalten wurden (siehe Abschnitt 2.4.3.1), wurde auch hier eine Detektion von VEGF aus *E. coli*-Zelllysate getestet.

Nach erfolgreicher Klonierung des VEGF-Gens in den pET-Vektor 29a konnte VEGF in *E. coli*-Zellen produziert werden (siehe Abschnitt 2.2.3.3). Hierfür standen zwei verschiedene Vektoren zur Verfügung: einer zur Produktion von S-getagtem VEGF₁₆₅ und einer für unmodifiziertes VEGF₁₆₅. In einem ersten Versuch wurden die aufgeschlossenen Zelllysate ohne Induktion sowie 4 h nach Induktion in einer Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/mL auf Nitrocelluloseslides gespottet. Zum Vergleich wurde zusätzlich kommerzielles VEGF₁₆₅ in einer Konzentration von 0,5 mg/mL aufgetragen. Die Detektion fand anschließend mit 5'-Cy3-V7t1 (100 nM) und 3'-Cy3-del5_1 (1000 nM) im Bindungspuffer, welcher mit 50 mM Kaliumchlorid versetzt war, statt. Die Abbildung 2.60 zeigt die Scans der Slides sowie eine SDS-PAGE-Analyse der verwendeten Proben.

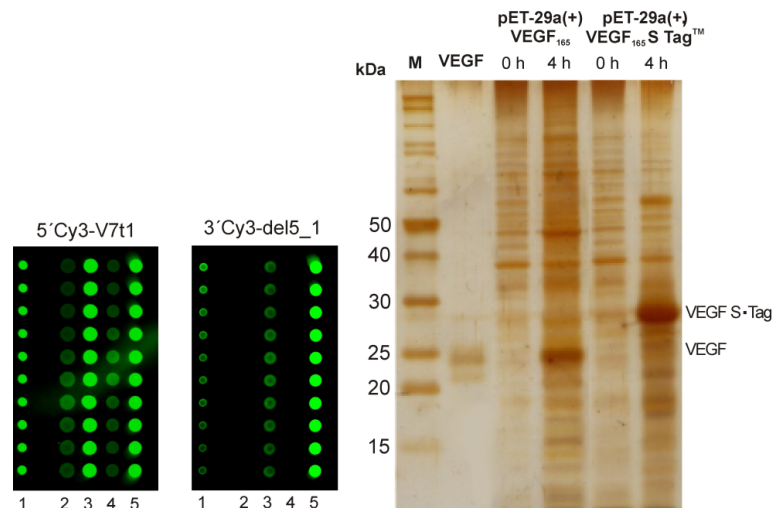


Abbildung 2.60 Detektion von VEGF₁₆₅ im *E. coli*-Zelllysate im *Reverse-Phase*-Format. Dargestellt sind die Microarray-Scans (1: kommerzielles VEGF, 2: VEGF Lys. (o.I.), 3: VEGF Lys. (4 h nach I.), 4: VEGF-S-Tag Lys. (o.I.) und 5: VEGF-S-Tag Lys. (4 h nach I.)) für die Detektionsaptamere 5'-Cy3-V7t1 (100 nM) und 3'-Cy3-del5_1 (1000 nM) sowie SDS-PAGE-Analyse der verwendeten Proben (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Sowohl das unmodifizierte als auch das S-getaggte VEGF₁₆₅ konnte im *E. coli*-Zelllysate mit den beiden Aptameren im *Reverse-Phase*-Format eindeutig nachgewiesen werden. Während in den Proben ohne Induktion nur ein sehr schwaches Signal zu sehen ist, zeigen die Proben 4 h nach Induktion ein starkes Fluoreszenzsignal und somit eine vermehrte Bindung der Detektionsaptamere.

Bei Betrachtung der relativen Signalintensitäten in Abbildung 2.61 ist deutlich der starke Anstieg der Werte bei den Zelllysaten 4 h nach der Induktion zu erkennen. Auffällig ist, dass die Signalintensität für das S-getaggte VEGF viel höher ist als für das unmodifizierte Protein, was auf eine höhere Menge an VEGF in dieser Probe hindeutet. Im SDS-PAGE-Gel der Proben (Abbildung 2.60) weist das S-getaggte VEGF eine stärkere Bande als das ungetaggte VEGF auf, was diese Vermutung bestätigt.

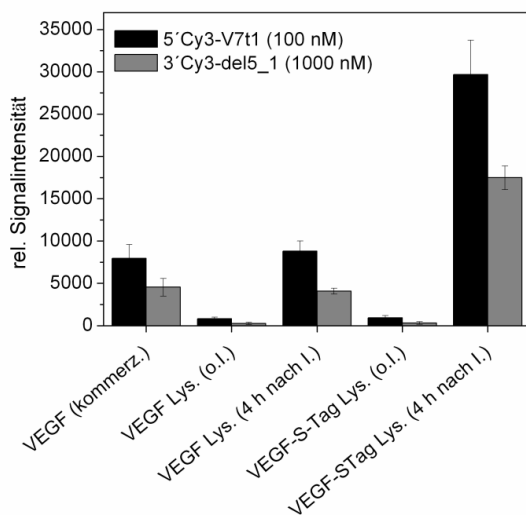


Abbildung 2.61 Erhaltene relative Signalintensitäten für die Detektion von VEGF im *E. coli*-Zelllysate mit den Detektionsaptameren 5'-Cy3-V7t1 und 3'-Cy3-del5_1 auf *Reverse-Phase*-Microarrays (PMT-Gain: 200).

Da die Detektion von VEGF₁₆₅ im Zelllysate mithilfe des aptamerbasierten *Reverse-Phase*-Microarrays erfolgreich war, wurde getestet inwiefern mit diesem Assay ein Aufreinigungsprozess von VEGF₁₆₅ verfolgt werden kann. Hierfür wurden drei verschiedene Proben der Heparinaufreinigung auf Nitrocelluloseslides gespottet; die Ausgangsprobe, welche auf die Säule gegeben wurde (Hep A), der Durchlauf (Hep D) und die Elutionsfraktion (Hep E, Elutionspeak 2) (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Die Inkubation fand mit Cy3-markiertem Aptamer V7t1 (100 nM) und del5_1 (1000 nM) statt. Die Ergebnisse dieser Detektion sind in

Abbildung 2.62 gezeigt. Zum Vergleich ist zusätzlich das Gel der SDS-PAGE der in Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Heparinaufreinigung dargestellt.

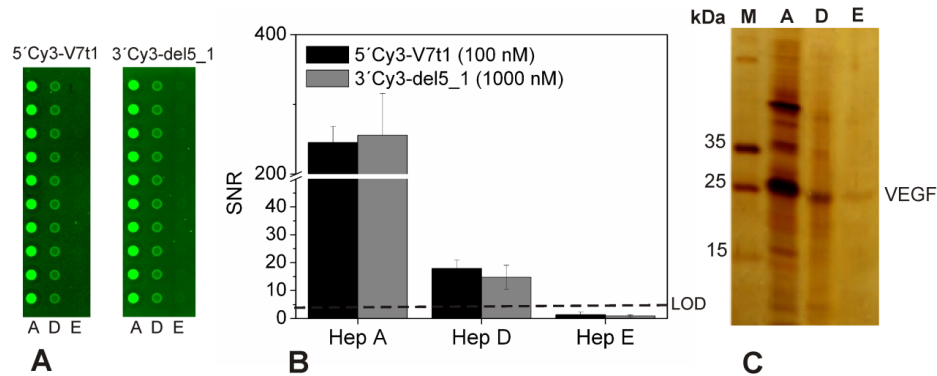


Abbildung 2.62 Untersuchung verschiedener Proben der Heparinaffinitätschromatographie des in *E. coli* hergestellten VEGF₁₆₅ im *Reverse-Phase*-Format mit den Aptameren 5'-Cy3-V7t1 und 3'-Cy3-del5_1. Aufgetragen sind A: Ausgangsprobe, D: Durchfluss und E: Elution. (A) Microarray-Scans, (B) SNR-Werte, (C) Scan des SDS-PAGE-Gels der untersuchten Proben (M: Marker).

Das hergestellte VEGF₁₆₅ konnte in der Ausgangsprobe sowie im Durchfluss nachgewiesen werden. In der Elutionsfraktion hingegen wurde mit beiden Aptameren nur sehr schwache Signale mit einer SNR kleiner als 3 erhalten. Die Empfindlichkeit dieses entwickelten Assays ist somit nicht hoch genug, um diese geringen Mengen des VEGF nachzuweisen, welche selbst im silbergefärbten Gel nur schwach sichtbar sind (Abbildung 2.62 C). Prinzipiell ist aber eine Anwendung dieses *Reverse-Phase*-Assays zur Kontrolle von Aufreinigungsprozessen möglich.

2.4.2.3 Zusammenfassung: Detektion von VEGF₁₆₅

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Aptamere V7t1 und del5_1 für eine Detektion von VEGF auf *Reverse-Phase*-Microarrays geeignet sind. Die Tabelle 2.10 fasst die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammen. Die Dissoziationskonstanten der beiden Aptamere unterscheiden sich erheblich, was sich in den optimalen Konzentrationen widerspiegelt. Für höchste SNR-Werte war in diesem Assay eine zehnfach höhere Konzentration an del5_1 nötig als an V7t1. Die Nachweisgrenzen liegen jedoch für beide Detektionsaptamere bei 0,01 mg/mL (217,39 nM). Neben reinem, kommerziellem VEGF war es aufgrund der hohen Spezifität dieses *Reverse-Phase*-Assays auch möglich in *E. coli* hergestelltes VEGF₁₆₅ direkt im Zellysat nachzuweisen.

Tabelle 2.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der Detektion von VEGF₁₆₅ mit *Reverse-Phase*-Microarrays auf Nitrocelluloseslides (16-Pad).

Aptamer	V7t1	del5_1
K_D [nM]	1,4 [34]	476,2 [64]
optimale Konz.	100 nM	1000 nM
Position des Cy3	5'	3'
Nachweisgrenze	0,01 mg/mL (217,39 nM)	0,01 mg/mL (217,39 nM)

Dieser aptamerbasierte *Reverse-Phase*-Microarray zur Detektion von VEGF₁₆₅ stellt eine gute Basis für die Entwicklung weiterer Microarray-Formate dar. Durch die Optimierung des Aufreinigungsprozesses von VEGF₁₆₅ (siehe Abschnitt 2.2.3.4) könnten ausreichende Mengen des Wachstumsfaktors zur Entwicklung des *Forward-Phase*- und des Sandwich-Assays bereitgestellt werden.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Herstellung aptamerbasierter Microarrays zur Detektion verschiedener Proteine konnte in dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt werden. Dabei wurden sowohl Assays im *Forward-Phase*-Format als auch im *Reverse-Phase*- und Sandwich-Format entwickelt und charakterisiert. Alle diese Formate werden zur Detektion in der Biosensorik benötigt. Mithilfe des *Forward-Phase*-Assays ist es möglich eine Vielzahl an Analyten in einer Probe simultan nachzuweisen, wohingegen der *Reverse-Phase*-Assay eine Analyse verschiedener Proben auf einem Microarray ermöglicht. Für eine höhere Sensitivität wird der Sandwich-Assay eingesetzt. Die erhaltenen Nachweisgrenzen aller im Rahmen dieser Arbeit entwickelter Microarray-Formate sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Im Vorfeld dieser Studie wurden zunächst die optimalen Bedingungen hinsichtlich der Spotting-Technologie, der Oberflächen und der verwendeten molekularen Spacer bestimmt. Je nach Format stellten sich andere Bedingungen als optimal heraus. Bezüglich des verwendeten Spotters (mit Kontakt oder kontaktfrei) zeigte sich im *Forward-Phase*-Format kein Unterschied. Im *Reverse-Phase*-Format hingegen lieferte der kontaktfreie Spotter in Kombination mit erhöhter Luftfeuchtigkeit (60%) bessere Ergebnisse als der Kontakt-Spotter. Zur Immobilisierung der Aptamere im *Forward-Phase*-Format bzw. im Sandwich-Format sind zweidimensionale Oberflächen mit langem und verzweigtem Oberflächenspacer optimal. Für den *Reverse-Phase*-Assay sind dreidimensionale Oberflächen aufgrund der höheren Proteinimmobilisierungskapazität vorteilhafter.

Tabelle 3.1 Nachweisgrenzen (LOD) der drei in dieser Arbeit entwickelten Microarray-Formate (*Forward*-, *Reverse-Phase* und Sandwich) zur Detektion von PFEI-his, F_C-Fragment und VEGF₁₆₅.

Format	PFEI-his	F _C -Fragment	VEGF ₁₆₅
<i>Forward</i>	5 nM (Epoxy-PEG) 3,3 nM (PEI-Ald. ¹)	1 nM (PEI-Ald. ¹)	-
<i>Reverse</i>	300 nM (Nitro. ²) 30 nM (Ald. ¹ , kontakt) 1500 nM (Ald. ¹ , kontakt-frei)	1000 nM (F _C , Nitro. ²) 60 nM (IgG 3, Nitro. ²)	217 nM (Nitro. ²)
<i>Sandwich</i>	-	2 nM (F _C , PEI-Ald. ¹)	-

¹ Ald.: Aldehydslides

² Nitro.: Nitrocelluloseslides

Als Ausgangspunkt der Microarray-Entwicklungen wurden anti His-Tag-Aptamere verwendet. Auf Basis eines bereits von Walter *et al.* (2008) entwickelten *Forward-Phase-Assays* zur Detektion His-getaggtter Proteine, wurde eine nähere Charakterisierung dieses Formats vorgenommen (siehe Abschnitt 2.4.1.1). Es konnte gezeigt werden, dass die zur Immobilisierung der Aptamere verwendete Oberfläche einen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität des Aptamers und somit die Detektion der Targetproteine hat. In einer umfassenden Untersuchung mit selbst hergestellten Oberflächen konnte das Aptamer 6H7 erfolgreich auf amino-, aldehyd- und epoxyfunktionalisierten Microarrays immobilisiert werden. Dabei hatten die Länge sowie der Verzweigungsgrad des verwendeten molekularen Oberflächenspacers direkten Einfluss auf die nachfolgende Bindung des Targetproteins. Nur wenn das Aptamer nach Immobilisierung in seiner optimalen dreidimensionalen Struktur vorliegt, ist eine ausreichende Targetbindung gewährleistet. Die epoxyfunktionalisierte Oberfläche mit dem langen, verzweigten Spacer lieferte dabei die besten Ergebnisse hinsichtlich der relativen Signalintensität. Eine Charakterisierung des Formats hinsichtlich der Nachweisgrenzen wurde mit PEI-Aldehyd- und Epoxy-PEG-Slides vorgenommen. Es konnten Nachweisgrenzen im nanomolaren Bereich (3,3 nM bzw. 5 nM) erzielt werden.

Desweiteren wurde Cy3-markiertes anti His-Tag-Aptamer 6H7 zur Entwicklung eines *Reverse-Phase-Microarrays* eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.1.2). Auch hier stellt neben der Position des Fluorophors (am 3'- oder am 5'-Ende) und der Spotting-Technologie (mit Kontakt oder kontaktfrei), die Wahl einer geeigneten Oberfläche einen entscheidenden Punkt dar. Es konnte gezeigt werden, dass Nitrocelluloseslides aufgrund der dreidimensionalen Membranstruktur eine weitaus höhere Proteinbindungskapazität aufweisen als planare aldehydmodifizierte Glasslides. Hinsichtlich der Nachweisgrenzen konnte jedoch mit den Aldehydslides in Kombination mit dem kontaktfreien Spotter die besten Ergebnisse erzielt werden (LOD = 30 nM). Nachdem eine hohe Spezifität des Assays hinsichtlich komplexer Proteinmischungen (FCS) nachgewiesen werden konnte, wurde die Detektion His-getaggtter Proteine in komplexen Proben realisiert.

Zusätzlich lieferte dieser erste Teil der vorliegenden Arbeit wichtige Ergebnisse für die weitere Entwicklung von Microarrays mit anderen Aptameren. Zur Detektion von Immunoglobulinen auf Microarrays wurden die Aptamere 264, 265 und 266 eingesetzt. Im *Forward-Phase-Format* konnte die Detektion von reinem humanem F_c-Fragment mit einer Nachweisgrenze von 1 nM durchgeführt werden (siehe Abschnitt 2.4.2.1). Eine Besonderheit

der Aptamere war eine ausgeprägte Gruppenspezifität, welche auch im *Reverse-Phase*-Format beobachtet werden konnte. Da die Selektion gegen F_c-Fragment durchgeführt wurde, binden die drei Aptamere nicht nur an humanes IgG sondern auch an die strukturell sehr ähnlichen IgGs verschiedener anderer Spezies, wie Ratte oder Ziege. Diese Gruppenspezifität gewährt eine breite Einsetzbarkeit der Aptamere zur Detektion oder Aufreinigung verschiedener Immunoglobuline. Mithilfe des *Reverse-Phase*-Formats konnten Nachweisgrenzen von bis zu 60 nM erzielt werden (siehe Abschnitt 2.4.2).

Aufgrund der dimeren Struktur des F_c-Fragments war es desweiteren möglich einen microarraybasierten Sandwich-Assay zur markierungsfreien Detektion von Antikörpern zu entwickeln (siehe Abschnitt 2.4.2.3). Hierbei stellte die Bestimmung der geeigneten „*Captamer*“ und „*Detectamer*“-Kombination den Schlüsselschritt dar. Nach einem Screening der drei Aptamere 264, 265 und 266, stellte sich Aptamer 265 als Fängermolekül und das Aptamer 266 als Detektionsaptamer als geeignet heraus. Mithilfe des Sandwich-Assays konnte humanes F_c-Fragment erfolgreich mit einer Nachweisgrenze von 2 nM nachgewiesen werden, was in einem ähnlichen Bereich wie die LOD des *Forward-Phase*-Assays liegt.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein *Reverse-Phase*-Assay zur Detektion des humanen Wachstumsfaktors VEGF₁₆₅ entwickelt (siehe Abschnitt 2.4.3). Mit zwei verschiedenen Aptameren, V7t1 und del5_1, konnte VEGF₁₆₅ mit einer Nachweisgrenze von 217,39 nM erfolgreich detektiert werden. Auch hier war mithilfe des *Reverse-Phase*-Microarrays eine Detektion des VEGF₁₆₅ aus einer komplexen Probe möglich. VEGF₁₆₅, welches in *E. coli* hergestellt wurde, konnte im Zelllysate detektiert werden. Durch Optimierung der Aufreinigungsstrategien des hergestellten VEGF₁₆₅, könnte auch hier die Entwicklung eines *Forward-Phase*- und Sandwich-Assays realisiert werden.

Um das große Potential der Aptamer-Microarrays weiter zu nutzen, sollte in weiteren Arbeiten einerseits das vielversprechende Sandwich-Format weiter optimiert und etabliert, aber auch weitere Detektionsmethoden entwickelt und untersucht werden. Ebenso könnten Multiplex-Aptamer-Microarrays zur Detektion verschiedener Proteine in einem einzigen Experiment den Nutzen dieser Technologie enorm erweitern.

Die Detektion des VEGF₁₆₅ im aptamerbasierten Sandwich-Format stellt einen interessanten Ansatzpunkt dar. Da zwei Aptamere gegen unterschiedliche Bindungsregionen des Wachstumsfaktors bekannt sind, ist die Anwendung dieser Aptamere im Sandwich-Format

besonders aussichtsreich. Die Durchführung eines Sandwich-Assays ist zwar aufgrund der Vielzahl erforderlicher Inkubierungsschritte sehr zeitaufwendig, aber mithilfe dieses Formats ist eine Proteindetektion möglich, ohne das Protein selbst markieren zu müssen.

Alternativ könnte daher an einer Detektion von unmarkierten Proteinen mit Aptamer-Beacons gearbeitet werden. Hierbei könnte zunächst ein fluoreszenzmarkiertes Aptamer analog zum *Forward-Phase*-Format auf einer Microarray-Oberfläche immobilisiert werden. Durch den Einsatz eines geeigneten komplementären Oligonucleotidstrangs mit Quencher wird das Fluoreszenzsignal bis zur Bindung des Targetproteins unterbunden. Zur Umsetzung dieses Formats ist jedoch ein intensives Screening hinsichtlich der optimalen Länge und Position der komplementären Nukleotidsequenz sowie des geeigneten Fluorophor und Quencher-Paars notwendig. Nach einer Etablierung dieses Assays könnte jedoch mit relativ wenig Aufwand eine schnelle Detektion von Proteinen ermöglicht werden.

Letztendlich stellen aptamerbasierte Microarrays eine vielversprechende Methode in der Proteinanalytik dar. Diese Technologie weist auch zukünftig noch ein enormes Entwicklungspotential auf.

Anhang

A Verwendete Materialien

A.1 Chemikalien

1,2,7,8-Diepoxyoctan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
1,4-Butandiolglycidylether	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
1,4-bis-(3-aminopropoxy)butan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
1,4-Phenylendiisocyanat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
1,4-Phenylendiisothiocyanat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Aceton	Fluka, Buchs, CH
Acetonitril	Fluka, Buchs, CH
Acryloylchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Agarose	Fluka, Buchs, CH
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bromphenolblau	Fluka, Buchs, CH
Calciumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Cobaltsulfat	Merck, Darmstadt, DE
Cyanurchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DEPC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dichlorethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
dNTP Set	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

D(+)-Trehalose	Fluka, Buchs, CH
Essigsäure	Fluka, Buchs, CH
Ethanol (95%)	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, CH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Buchs, CH
Formaldehydlösung (36,5%)	Fluka, Buchs, CH
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycerin	Fluka, Buchs, CH
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Hefeextrakt	Fluka, Buchs, CH
Imidazol	Merck, Darmstadt, DE
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	AppliChem, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Kaliumhydroxid	Fluka, Buchs, CH
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Methanol (99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs, CH
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Nickelsulfat	Fluka, Buchs, CH
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
N,N-Dimethylformamid	Fluka, Buchs, CH
Pyridin (>99,8%)	Fluka, Buchs, CH
Rhamnose	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Salzsäure (30%)	Fluka, Buchs, CH
Schwefelsäure	Fluka, Buchs, CH
SYBR Green I	Amresco, Solon, OH, USA
SYBR Green II	Amresco, Solon, OH, USA
Terephthaldialdehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tetraethylenpentamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Toluol	Fluka, Buchs, CH
TopBlock	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trichloressigsäure	Fluka, Buchs, CH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Trypton Plus	Fluka, Buchs, CH
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Zinksulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

A.2 Kits

Cy3 mono-Reactive Dye Pack	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena, DE
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, DE
QIAGEN Plasmid Mini/Midi Kit	QIAGEN, Hilden, DE
S•Tag™ Thrombin Purification Kit	Merck KGaA, Darmstadt, DE
WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit	Invitrogen, Carlsbad, USA

A.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von Reinstwasser (Arium 611, Sartorius, Göttingen, DE) hergestellt. Alle Puffer, welche zum Waschen der Microarrays verwendet wurden, wurden steril filtriert (Sartolab, Bottle Top Filter, PES 0,2 µm Pore Size, Sartorius Stedim, Göttingen). Die Lösungen für die Proteinaufreinigung wurden ebenfalls filtriert und zusätzlich im Ultraschallbad entgast.

LB-Medium	10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, autoklaviert
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
SOC	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7,0 autoklaviert
SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
TAE	40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TGS	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

Aptamer-Selektionspuffer:

Akmer-BP	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , pH 7,3
PBS-6H7	50 mM K ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,5 [135]

PBST-6H7	50 mM K ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5 [135]
TBSE	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, pH 7,0 [34]
TBSTE	TBSE und 0,05% Tween 20 [34]

A.4 Biomoleküle

A.4.1 Aptamere

Die verwendeten Aptamere wurden durch die Firma BioSpring (Frankfurt a. Main, DE) synthetisiert.

6H7	GCTATGGGTGGTCTGGTTGGGATTGGCCCCGGGAGCTGGC
6H5	GGCTTCAGGTTGGTCTGGTTGGGTTTGGCTCCTGTGTACG
264	TACGACTCACTATAGGGATCCTTGCTTACATTACGACGTACTGAATT CCCTTTAGTGAGGGTT
265	TACGACTCACTATAGGGATCCATAGAAAACCCCTAAACGCCCGAAT TCCCTTTAGTGAGGGTT
266	TACGACTCACTATAGGGATCCTACGTCATTATGGAAACCGACGAAT TCCCTTTAGTGAGGGTT
V7t1	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA
del5_1	ATACCAGTCTATTCAATTGGGCCCCGTCCGTATGGTGGGTGTGCTGGC CAG

A.4.2 Antikörper

Anti-Human VEGF Polyclonal Antibody	Biovision, Mountain View, USA
Anti-Human IgG Cy3 Antibody	Dianova, Hamburg, DE
Goat Immunoglobulin Cy3 (D/P: 2,7)	Dianova, Hamburg, DE
Humanes F _c -Fragment	Dianova, Hamburg, DE
Humanes F _c -Fragment Cy3 (D/P: 3,2)	Dianova, Hamburg, DE

Human Immunoglobulin Cy3 (D/P: 2,2)	Dianova, Hamburg, DE
Humanes Immunoglobulin 1	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Humanes Immunoglobulin 2	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Humanes Immunoglobulin 3	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Humanes Immunoglobulin 4	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Humanes Immunoglobulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Mouse Immunoglobulin Cy3 (D/P: 2,1)	Dianova, Hamburg, DE
Penta-His Alexa Fluor 555 Conjugate	QIAGEN, Hilden, DE
Rat Immunoglobulin Cy3 (D/P: 2,5)	Dianova, Hamburg, DE

A.4.3 Enzyme/Proteine

GoTaq™ DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
SacI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
NotI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
NdeI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
PstI	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Reverse Transcriptase	Promega, Madison, USA
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
VEGF ₁₆₅	Dianova, Hamburg, DE

A.4.4 Plasmide

pBADGFPhis	Institut für Technische Chemie (Doktorarbeit M. Reck [162])
pET-29a(+)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

pET-bgl-his

Universität Bielefeld (Prof. Dr. Karl Friehs)

pJOE2702

Universität Greifswald (Prof. Uwe T. Bornscheuer)

A.4.5 Sonstiges

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot, DE

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot, DE

JM109 Competent Cells

Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Rosetta2(DE3)pLysS Competent Cells

Merck KGaA, Darmstadt, DE

A.4.6 PCR-Primer und Sequenzen

GAPDH

Forward: ACAGTCAGCCGCATCTTCTT

Reverse: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

NdeI_VEGF

Forward: GGTGGTCATATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTCCA

PstI_VEGF

Reverse: GGTGGTCTGCAGTCACCGCCTCGGCTTGTCACAT

VEGF

Forward: AAGGAGGAGGGCAGAATCAT

Reverse: ATCTGCATGGTGATGTTGGA

VEGF₁₆₅-Gen-Sequenz

```
ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTCCACTGGAGTCTGGCTCTGCTCCT
GTACCTCCATCATGCCAAATGGTCACAGGCTGCCCAATGGCTGAG
GGCGGAGGCCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTTATGGACGTC
TACCAGAGATCTTACTGTACCCTATCGAGACACTCGTGGACATTT
TTCAGGAGTACCCGACGAGATTGAATACATCTTCAAACCATCTCT
GTGTGCCTCTCATGAGATGTGGAGGATGTGTAATGATGAGGGGCTG
GAATGTGTCCCTACTGAGGAGTCCAATATCACAATGCAGATTATGA
GGATCAAACCCACCAGGGCCAGCATATCGGAGAAATGAGCTTTC
TCCAGCACAACAAATGCGAGTGTAGGCCCAAAAAGGATAGAAGCA
CGGCAGGAAAACCCTTGCGGACCTTGAGCGAACGGCGAAAACACC
TGTTTGTCCAGGATCCACAGACCTGTAATGCTCTTGTA AAAACAC
CGACTCTCGCTGTAAGGCTCGCCAGCTCGAACTGAATGAACGGACA
TGCCGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGA
```

VEGF₁₆₅-Proteinsequenz

```
MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFM
DVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSLCASHEMWRMCNDEGLE
CVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRSTAGK
```

PLRTLSEERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKP
RR

VEGF₁₆₅S-Tag-Proteinsequenz

MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMADIGSEFELSHMNFLLSWV
HWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCH
PIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSLCASHEMWRMCNDEGLECVPTESNIT
MQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHKNKCECRPKKDRSTAGKPLRTLSEERR
HLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR

A.5 Microarray-Oberflächen

Glasobjektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
NEXTERION® Slide NC 1Pad/16 Pad	SCHOTT, Jena, DE
SciCHip Epoxy-PEG	SCIENION AG, Berlin, DE
SciCHip Epoxy-PEG1	SCIENION AG, Berlin, DE
SciCHip Epoxy	SCIENION AG, Berlin, DE
VSS-25 Silylated Slides (Aldehyd)	CEL Associates, Pearland, USA

A.6 Verbrauchsmaterialien

Centrifugal Filter Units 3kDa	Millipore, Billerica, USA
Glas-Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, DE
<i>falcon tubes</i> 15 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<i>falcon tubes</i> 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
HiTrap™ Heparin HP Columns	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Microflex® Supreno™ powder-free gloves	Microflex Corporation, Reno, USA
Mikrotiterplatte	Abgene, Rochester, USA
Minisat High Flow Filters	Sartorius, Göttingen, DE
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, DE
PLASTIBRAND Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, DE

Immun-Blot PVDF-Membran	BIO-RAD, München, DE
Reagiergefäße 0,1 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäße 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäße 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sartobind S 75	Sartorius, Göttingen, DE
Secure Seal Hybridisation Chamber	Grace Biolabs, Bend, USA
Sterican Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE
Thermo-Seal Schmelzklebefolien	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vivaspin 20 3,000 MWCO	Sartorius, Göttingen, DE
Vivaspin 20 10,000 MWCO	Sartorius, Göttingen, DE
Vivaspin 500 3,000 MWCO	Sartorius, Göttingen, DE

A.7 Geräte

Autoklav	Systec V-150	Systec GmbH, Wettengel, DE
Brutschrank	CertomatR HK	B. Braun, Melsungen, DE
FPLC	BioLogic DuoFlow System	BIO-RAD, München, DE
Gelelektrophorese	Agagel Midi-Wide	Biometra, Göttingen, DE
	MiniProtean™ Tetra Cell	BIO-RAD, München, DE
	Power Pac 3000	BIO-RAD, München, DE
	Rotiphorese Proclamp MINI	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	Thermo EC 105	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Thermo EC Classic	Thermo Scientific, Waltham, USA
Hybridisierungsöfen	Thermo Hybaid	Thermo Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	HI 221 Calibration Check	Hanna Instruments, Kehl, DE
Plattenschweißgerät	ALPSTM 50V	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen, DE

Microarrayscanner	GenePix®4000B	Axon Instrum., Foster City, USA
Schüttelschrank	Certomat BS1	Sartorius, Göttingen, DE
Schüttler	MTS 4	IKA, Staufen, DE
	VIBRAX VXR basic	IKA, Staufen, DE
Slideaufsatz:	Eppendorf slides	Eppendorf, Hamburg, DE
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000	NanoD. Techn., Wilmington, USA
	Nanodrop ND-3000	NanoD. Techn., Wilmington, USA
Spotter	Affymetrix 417TM Arrayer	Affymetrix, Santa Clara, USA
	NanoPlotter NP 2.1	GeSiM, Großerkmannsdorf, DE
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler 154	Thermo Scientific, Waltham, USA
	VWR DOPPIO	VWR, Darmstadt, DE
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	BANDELIN, Berlin, DE
Western Blot	Criterion™ Blotter	BIO-RAD, München, DE
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DE
	Megafuge 1.0 RS	Heraeus Instruments, Osterode, DE

A.8 Software

BioEdit 7.0.9	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
Clustal W	EMBL-EBI, Cambridge, UK
GMS 417 Arrayer Version 1.5.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
GenePix®Pro 6.1	Axon Instruments, Foster City, USA
GENTle	University of Cologne, Cologne, DE
Mfold Web Server	University of New York, New York, USA
NanoPlotter NPC16	GeSiM, Großerkmannsdorf, DE
NCBI Blast	Nat. Center for Biotech. Information, Bethesda, USA
Origin 8.5	OriginLab, Northampton, USA

Primer3	University of Massachusetts Medical School, USA
QGRS Mapper	Ramapo College, Mahwah, USA
Vector NTI Advance 11	Invitrogen, Carlsbad, USA

B Verwendete Methoden

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die in dieser Arbeit häufig eingesetzten Methoden beschrieben. Anschließend wird auf die verwendeten und optimierten Protokolle dieser Dissertation in chronologischer Reihenfolge eingegangen. Für die Herstellung aller Lösungen wurde Reinstwasser (Arium 611, Sartorius, Göttingen, DE) eingesetzt. Die verwendeten Pipettenspitzen, Reagier-, Zentrifugier- und Glasgefäße waren steril.

B.1 Allgemeine Methoden

B.1.1 PCR mit *Taq*-Polymerase

Für die PCR mit der GoTaq™ DNA Polymerase wurde pro Probe folgender Mix mit einem Gesamtvolumen von 50 µL erstellt (für mehrere Proben wurde ein entsprechender Mastermix angesetzt):

- 1 µL cDNA (500 ng)
- 1 µL *forward* Primer (10 pM)
- 1 µL *reverse* Primer (10 pM)
- 0,25 µL *Taq*-Polymerase
- 4 µL DNTP-Mix (2 mM)
- 10 µL 5 x Reaktionspuffer
- 32,75 µL nukleasefreies Wasser

Für eine PCR unter Standardbedingungen wurde nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 5 min folgendes Programm durchlaufen:

- Denaturierung: 95 °C, 30 sec
- Primer-*Annealing*: 55-70 °C (Primer-abhängig), 30 sec
- Elongation: 72 °C, 30 sec

Wiederholung der Schritte: 35-mal

- Abschließende Elongation: 72 °C, 7 min

B.1.2 PCR mit *Pfu*-Polymerase

Für die PCR mit der *Pfu* DNA Polymerase wurde pro Probe folgender Mix mit einem Gesamtvolumen von 50 μ L erstellt (für mehrere Proben wurde ein entsprechender Mastermix angesetzt):

- 1 μ g DNA (Plasmid)
- 1 μ L *forward* Primer (10 pM)
- 1 μ L *reverse* Primer (10 pM)
- 0,5 μ L *Pfu*-Polymerase
- 5 μ L DNTP-Mix (2 mM)
- 5 μ L 10 x Reaktionspuffer
- mit nukleasefreiem Wasser auf 50 μ L auffüllen

Für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase wurde nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min folgendes Programm durchlaufen:

- Denaturierung: 95 °C, 30 sec
- Primer-*Annealing*: 55-70 °C (Primer-abhängig), 30 sec
- Elongation: 72 °C, 2 min

Wiederholung der Schritte: 35-mal

- Abschließende Elongation: 72 °C, 15 min

B.1.3 Herstellung von Agarplatten

1 L LB-Medium wurde mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert (20 min, 121 °C). Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde das jeweilige Antibiotikum zugegeben (Ampicillin: 4 mL Stammlösung (25 mg/mL), Chloramphenicol: 3 mL Stammlösung (10 mg/mL)) und das Medium in die Petrischalen gegossen.

B.1.4 Herstellung von Gefrierkulturen

Zur Herstellung der Gefrierkulturen wurde eine Hauptkultur angeimpft und bei einer OD_{600} von 0,6 wurden 500 μ L der Hauptkultur mit 500 μ L Glycerin vermischt und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Gefrierkulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

B.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

- 2 x Probenpuffer (Ansatz für 10 mL): 9,5 mL Formamid, 25 μ L 10% SDS, 2,5 mg Bromphenolblau, 2,5 mg Xylencyanol FF, 250 μ L 1% EtBr, 10 μ L 0,5 M EDTA

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1,0 g Agarose (für 1%ige Gele) bzw. 1,5 g Agarose (für 1,5%ige Gele) in 100 mL Reinstwasser suspendiert und anschließend in der Mikrowelle bei 600 W kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 10 μ L Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel gegossen.

Pro Geltasche wurden 7,5 μ L der zu untersuchenden RNA- bzw. DNA-Probe und 7,5 μ L des 2 x Probenpuffers gegeben. Die Auftrennung der Oligonukleotide erfolgt für 1-2 h bei 100 V. Die Visualisierung des Gels wurde über UV-Detektion mit einem INTAS UV-System (Gel iX Imager) durchgeführt.

B.1.6 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde in dieser Arbeit das kommerziell erhältliche Plasmid Mini bzw. Midi Kit von QIAGEN verwendet. Die Plasmide wurden zunächst in *E. coli*- Zellen vermehrt. Hierfür wurde in einem 100 mL Kolben eine Hauptkultur angesetzt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht bei 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden 5 mL (Mini Kit) bzw. 25 mL (Midi Kit) der Kulturlösung abzentrifugiert und die Zellpellets entsprechend des Protokolls von QIAGEN verarbeitet.

Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA wurde am NanoDrop ND-1000 bestimmt.

B.1.7 Gelextraktion

Die Gelextraktion wurde in dieser Arbeit mit dem kommerziell erhältlichen QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN durchgeführt. Hierfür wurden die zu reinigenden PCR-Produkte bzw. Produkte des Restriktionsverdau mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die Aufreinigung gemäß dem Protokoll von QIAGEN durchgeführt.

Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde am NanoDrop ND-1000 bestimmt.

B.1.8 Restriktionsverdau

Von der aufgereinigten, zu schneidenden DNA wurden 0,5 bis 1 µg mit je 1 µL pro benötigtes Restriktionsenzym (10 u/µL) und geeignetem Restriktionspuffer versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit Reinstwasser auf 20 µL aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung (Temperatur/Zeit: unterschiedlich, je nach verwendetem Enzym) wurde die Reaktion gestoppt.

Das Volumen und die Art des Restriktionspuffers für die unterschiedlichen Doppelverdauungen mit zwei Restriktionsenzymen wurden mithilfe des DoubleDigest Tools (www.fermentas.de) ermittelt.

B.1.9 Ligation

Nach Aufreinigung wurde der restriktionsverdaute Vektor im molaren Verhältnis von 5:1 mit dem restriktionsverdauten Insert versetzt. Dem Ansatz wurden 1 µL T4-DNA-Ligase (5 u/µL) und 2 µL 10 x Ligationspuffer zugefügt. Nach Auffüllen der Lösung mit Reinstwasser auf 20 µL Gesamtvolumen wurde die Ligation bei 16 °C über Nacht in einem PCR-Thermocycler durchgeführt.

B.1.10 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die bei -80 °C gelagerten chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 30 µL der Zellen wurden mit 5 µL des Transformationsansatzes versetzt und suspendiert. Nach einer 15

minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem zweiminütigem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Sofort im Anschluss wurden die Zellen 2 min auf Eis gestellt und 500 µL SOC Medium zugefügt. Der Transformationsansatz wurde für 60 min bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen für 3 min bei 3000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, DE) pelletiert und der Überstand bis auf ca. 150 µL verworfen. Die Zellen wurden im Restvolumen suspendiert und auf die Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

B.1.11 Kolonie-PCR

Einzelne Bakterienkolonien auf der Agarplatte wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und die Zellen in ein mit nukleinsäurefreiem Wasser (10 µL) gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde 5 min bei 95 °C inkubiert und 5 µL dieser Probe wurden als Template in einer nachfolgenden PCR-Reaktion (mit *Taq*-Polymerase) eingesetzt. Der Nachweis positiver Kolonien erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese mit dem reinen Insert als Positiv- und Wasser als Negativkontrolle.

B.1.12 SDS-PAGE

- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS; pH 8,3 (1 x TGS)
- SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA (Na-Salz), 5% SDS, 0,02% Bromphenolblau in 90 mL H₂O, direkt vor der Benutzung werden 10% 2-Mercaptoethanol und 10% Glycerin (55%) zum Probenpuffer hinzu gegeben

Tabelle B.1 Zusammensetzung des (A) Trenngels und (B) Sammelgels.

Komponente	12 %	16 %	Komponente	6%
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 %ig	4,5 mL	6 mL	Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 %ig	750 µL
SDS (1 %)	1,5 mL	1,5 mL	SDS (1 %)	300 µL
Tris/HCl (1,5 M), pH 8,8	4,2 mL	4,2 mL	Tris/HCl (1,5 M), pH 6,8	630 µL
ddH ₂ O	4,8 mL	3,3 mL	ddH ₂ O	3,770 mL
TEMED	30 µL	30 µL	TEMED	10 µL
APS (25%)	30 µL	30 µL	APS (25%)	10 µL
A			B	

Die Komponenten des Trenngels wurden in der angegebenen Reihenfolge vermischt und die Lösung in die SDS-PAGE-Apparatur pipettiert. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Proteinproben wurden 1:1 mit dem Probenpuffer vermischt und 10 Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben und der Protein-Ladder (Unstained Protein Ladder, 4 µL) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 100 V, nach dem Durchlaufen des Sammelgels bei 150 V. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaufront bis ans untere Ende des Gels gelaufen waren.

Silberfärbung

- Entfärber/Fixierer: 500 mL H₂O, 500 mL EtOH, 100 mL Essigsäure
- Farmers Reducer: 0,1% Kaliumhexacyanoferrat(III) und 0,1% Natriumthiosulfat
- 2,5%ige Natriumcarbonatlösung
- 5%ige Essigsäure
- 0,1%ige Silbernitratlösung

Die Färbung der Gele wurde auf dem Schüttler durchgeführt. Zunächst wurde das Gel für 30 min im Färber/Fixierer geschüttelt. Nach zweimaligem kurzem Waschen mit Reinstwasser wurde das Gel 2,5 min in 100 mL Farmers Reducer gelegt. Anschließend wurde das Gel 5 min in Reinstwasser gewaschen und 30 min in Silbernitratlösung inkubiert. Das Gel wurde zweimal 30 sec mit Reinstwasser und Natriumcarbonatlösung gespült. Zur Bandenentwicklung wurde das Gel in 100 mL Natriumcarbonatlösung mit 400 µL Formaldehydlösung (36,5%) inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurde das Gel in Essigsäure gelegt.

B.1.13 Western-Blot

- Transferpuffer: 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 10% Ethanol, pH 8,3

Nach der Durchführung einer SDS-PAGE-Analyse wurden die Proteine auf dem erhaltenen SDS-Gel auf eine PVDF-Membran mittels Elektroblothing transferiert und anschließend die Bandenentwicklung mittels des kommerziell erhältlichen Western Breeze Chromogenetic Kit (Anti Rabbit) von Invitrogen durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Durchführung dargestellt:

- Die PVDF-Membran wurde kurz in 95%igem Ethanol gewaschen.
- Das SDS-Gel, die Membran, 2 Filterpapiere und 2 Filz pads wurden getrennt voneinander in Transferpuffer geschwenkt.
- Die Trans-Blot-Zellkammer (BIO-RAD, München, DE) wurde mit dem Transferpuffer gefüllt, das Gel und die Membran zwischen die Filterpapiere und Pads gespannt und in die Apparatur gestellt.
- Der Proteintransfer wurde 60 min lang bei 100 V und 150 mA unter Kühlung durchgeführt.
- Die Bandenentwicklung auf der Membran wurde anschließend nach dem Protokoll des Kits von Invitrogen durchgeführt.

B.2 Bereitstellung der Targetproteine

B.2.1 His-Tag-Proteine

Die His-getaggten Proteine PFEI, Bgl und GFP wurden in *E. coli*-Zellen (siehe Tab. 2.2) produziert und mittels IMAC aufgereinigt. Im Folgenden werden die Durchführungen zur Gewinnung, Aufreinigung sowie Fluoreszenzmarkierung der drei Proteine beschrieben.

B.2.1.1 Kultivierung

Zur Herstellung der Vorkultur wurden im 100 mL Schüttelkolben 20 mL LB-Medium mit 200 µL *E. coli* der entsprechenden Gefrierkultur und 60 µL Ampicillinstammlösung (25 mg/mL) (PFEI-his, Bgl-his) bzw. 40 µL Chloramphenicolstammlösung (10 mg/mL) (GFP-his) versetzt. Die Kultur wurde über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden in 500 mL Schüttelkolben 100 mL LB-Medium mit 300 µL Ampicillin (PFEI-his, Bgl-his), bzw. 200 µL Chloramphenicol (GFP-his) versetzt und 1 mL der jeweiligen Vorkultur hinzu gefügt. Die Kultur wurde 2 - 4 h im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 - 0,8 fand die Induktion für PFEI-his und Bgl-his mit 1 mL IPTG (1 mM Endkonzentration im Kolben) und für GFP-his mit 1 mL L-

Arabinose (1 mM Endkonzentration im Kolben) statt. Die Kulturen wurden weitere 4 h im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

B.2.1.2 Isolierung der Proteine

Die Kulturen wurden in 50 mL Zentrifugiergefäße überführt und bei 4000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Falle des PFEI-his und GFP-his verworfen. Die Zellpellets wurden anschließend in 2-4 mL 1 x PBS resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde 3 mal 1 min (90 W, 0,6 s Pulsdauer) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Erfolg der Kultivierung wurde mittel SDS-PAGE-Analyse ermittelt.

Für das Bgl-his, welches extrazellulär in *E. coli* produziert wurde, wurde kein Zellaufschluss durchgeführt. Nach dem Kultivieren wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand aufkonzentriert (Vivaspin 20, 10,000 MWCO, Sartorius, Göttingen, DE) und in einer SDS-PAGE-Analyse auf Bgl-his überprüft.

B.2.1.3 Aufreinigung

Die Aufreinigung der drei His-getaggen Proteine PFEI, Bgl und GFP fand mit Metallchelataffinitätschromatographie (*Immobilized Metal Chelate Chromatography*- IMAC) statt. Die Proteinaufreinigung wurde zunächst mit 8-strips-Membranen zur Bestimmung der besten Metallsalzlösung und anschließend in größerem Maßstab mittels FPLC und Sartobind IDA-Membranen durchgeführt.

B.2.1.3.1 Vivawell-8-Strips

- Metallsalzlösungen: 0,5 M CoCl₂ / 0,5 M NiSO₄ / 0,5 M CuSO₄ bzw. 0,5 M ZnSO₄
- Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
- Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
- Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Im folgenden Abschnitt ist die Durchführung der Aufreinigung mit den 8-Strips beschrieben. Pro *well* wurden 300 µL Flüssigkeit verwendet und die Zentrifugation fand jeweils bei 1200 g statt. Alle verwendeten Puffer und Kulturüberstände wurden zuvor steril filtriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad entgast.

- Die Wells der 8-Strips wurden mit Reinstwasser angefeuchtet und für 1 min zentrifugiert.
- Die Metallsalzlösungen wurden auf die Membranen gegeben und für 1 min zentrifugiert, dieser Schritt wurde einmal wiederholt.
- Die Membranen wurden zweimal mit Reinstwasser gewaschen und je 1 min zentrifugiert.
- Die Wells wurden zweimal mit Bindungspuffer equilibriert und je 1 min zentrifugiert.
- Die proteinhaltige Probe wurde auf die Membranen gegeben und 3 min zentrifugiert.
- Nachfolgend wurde dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen und je 3 min zentrifugiert.
- Das Protein wurde in drei Schritten mit dem Elutionspuffer eluiert, je 3 min zentrifugiert.

Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE-Analyse kontrolliert.

B.1.2.3.2 Sartobind IDA (FPLC)

- Equilibrierungspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5
- Metallsalzlösungen: 0,1 M CoCl₂ / 0,1 M NiSO₄ / 0,1 M CuSO₄ bzw. 0,1 M ZnSO₄ in Equilibrierungspuffer, pH 4,5
- Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, pH 8,0
- Elutionspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, 0,1 M Imidazol, pH 4,5

Im folgenden Abschnitt ist die Durchführung der Aufreinigung mit FPLC beschrieben. Als Membranadsorbereinheit wurde die Sartobind IDA 75 eingesetzt. Alle verwendeten Puffer und Kulturüberstände wurden zuvor steril filtriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad entgast. Die Aufreinigung fand mit einer Flussrate von 1 mL/min statt und wurde mit einem Durchflussdetektor bei 280 nm verfolgt.

- Die Membranadsorbereinheit wurde mit 10 mL Equilibrierungspuffer gespült.
- Anschließend fand die Beladung mit 10 mL 0,1 M Metallsalz-Lösung statt.
- Überschüssiges Metallsalz wurde mit 20 mL Equilibrierungspuffer abgewaschen.
- Die Membran wurde mit 20 mL Bindungspuffer gespült.
- Die proteinhaltige Probe wurde in dem Bindungspuffer verdünnt und über die Adsorbereinheit geleitet.
- Die Elution erfolgte mit 20 mL Elutionspuffer.

- Zur Regeneration der Membran wurde mit 10 mL Equilibrierungspuffer gewaschen und die Metallionen wurden mit 10 mL Schwefelsäure entfernt.
- Die Membran wurde mit 20 mL Equilibrierungspuffer gewaschen und wurde in Equilibrierungspuffer mit 0,02% Natriumazid gelagert.

Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE-Analyse kontrolliert.

B.2.1.4 Fluoreszenzmarkierung

Zur Markierung der His-getaggen Proteine für die Anwendung auf *Forward-Phase-Microarrays* wurde der kommerziell erhältliche Farbstoff Cy3 Mono-Reactive-Dye (GE Healthcare, Chalfont ST Giles, GB) verwendet. Das Labeling wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Die aufgereinigten Proteinlösungen wurden mit Natriumcarbonatpuffer (0,1 M) auf eine Konzentration von 1 mg/mL gebracht.
- 200 µL der Proteinlösung wurden zu einem *Vial* des Fluoreszenzfarbstoffs gegeben und gut durchmischt.
- Die Inkubation fand bei RT für 1 h unter Lichtausschluss mit zusätzlicher Durchmischung alle 15 min statt.
- Die markierte Proteinlösung wurde anschließend mehrfach mit Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren umgepuffert, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

B.2.2 VEGF₁₆₅

Im folgenden Abschnitt sind die Klonierung des VEGF₁₆₅ in den PET-Expressionsvektor, die Herstellung in *E. coli*, sowie die Aufreinigungsversuche detailliert beschrieben. Die verwendeten Primer für die PCR wurden mit dem Programm Primer3 designed.

B.2.2.1 Klonierung

In einem ersten Schritt wurde das Gen VEGF₁₆₅ aus dem Vektor der CHO-Zelllinie gewonnen. Hierfür wurde aufgrund der geringeren Fehlerquote eine PCR mit *Pfu*-Polymerase

mit den Primern NdeI_VEGF und PstI_VEGF durchgeführt. Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion wurde der Genabschnitt sowie der Vektor pGEM-5Zf(+) mit den Restriktionsenzymen NdeI und PstI verdaut. Durch nachfolgende Ligation des ebenfalls aufgereinigten, linearisierten Vektors mit dem VEGF-Gen wurde pGEM-5Zf(+)-VEGF₁₆₅ erhalten.

Ausgehend von diesem Vektor konnte durch erneuten Restriktionsverdau mit NotI und NdeI bzw. NotI und SacI das VEGF-Gen in den mit denselben Enzymen linearisierten Expressionsvektor pET-29a(+) eingeführt werden (siehe Abschnitt 2.2.3.2, Abbildung 2.9). Anschließend wurden die beiden erhaltenen Vektoren in *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS transformiert und die Zellen auf Agarplatten ausplattiert. Einzelne Klone wurden gepickt und in Kultur überführt. Durch die Überprüfung des erhaltenen Plasmids (Restriktionsverdau, Sequenzierung, Kolonie-PCR) wurde der Erfolg der Klonierung bestätigt.

B.2.2.2 Kultivierung

Zur Herstellung der Vorkultur wurden in 100 mL Schüttelkolben 20 mL LB-Medium mit 200 µL *E. coli* der entsprechenden Gefrierkultur und 20 µL Kanamycinstammlösung (34 mg/mL) und 68 µL Chloramphenicolstammlösung (10 mg/mL) versetzt. Die Kultur wurde über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden in 500 mL Schüttelkolben 100 mL LB-Medium mit 100 µL Kanamycinstammlösung (34 mg/mL) und 340 µL Chloramphenicolstammlösung (10 mg/mL) versetzt und 1 mL der jeweiligen Vorkultur hinzu gefügt. Die Kultur wurde 3-5 h im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 - 0,8 fand die Induktion mit 1 mL IPTG (1 mM Endkonzentration im Kolben) statt. Die Kultur wurde weitere 4-6 h im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

B.2.2.3 Nachweis des VEGF auf Genebene

Zum Nachweis des VEGF-Gens wurde aus den Zellpellets zunächst die gesamte RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine PCR (mit *Taq*-Polymerase, siehe Abschnitt B.1.1) durchgeführt. Hierfür wurden VEGF-spezifische Primer sowie Primer für das Haushalts-Gen GAPDH verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt und die Proben wurden stets auf Eis gekühlt.

B.2.2.3.1 RNA-Isolierung aus E. coli mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Zunächst wurden etwa 10^9 -Zellen bei 4.000 x g für 10 min abzentrifugiert und in 900 μ L Lysozym-Lösung (1 mg/mL gelöst in TE-Puffer, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde die RNA-Isolierung nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- Überführen der Lösung in ein 2 mL Reagiergefäß.
- Zugabe von 90 μ L 10% SDS.
- Erhitzen auf 65 °C für 2 min.
- Zugabe von 100 μ L Natriumacetat (1 M in DEPC-Wasser, pH 5,2)
- Zugabe von 1 mL mit DEPC-Wasser gesättigtem Phenol (pH unter 7,0).
- 10-mal invertieren.
- Inkubieren bei 65 °C für 6 min, dabei alle 40 s 10-mal invertieren.
- Abkühlen auf Eis für 2 min.
- Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C für 10 min.
- Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues 2 mL Reagiergefäß.
- Zugabe von einem Volumen Chloroform zur wässrigen Phase
- 10-mal invertieren.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g und 4 °C für 5 min.
- Wiederholen der letzten vier Schritte.
- Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues 2 mL Reagiergefäß.
- Zugabe von 1/10 Volumen 5 M Natriumchlorid.
- Zugabe von 2 Volumen reinen, kalten Ethanol (-20 °C)
- Inkubieren bei -80 °C für 20 min.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g und 4 °C für 15 min.
- Verwerfen des Überstands.
- Zum Waschen des Pellets Übersichten mit 1 mL 75% Ethanol.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g und 4 °C für 5 min.
- Verwerfen des Überstands.
- Trocknen des Pellets mit Druckluft.
- Lösen der RNA in 50 μ L RNase-freiem Wasser.

B.2.2.3.2 DNase I-Verdau

Zu 50 μL der RNA-Lösung wurde gegeben:

- 12,5 μL 25 mM MgCl_2
- 1,25 μL 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
- 1 μL DNase I

Anschließend wurde der DNase-Verdau nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Inkubieren bei 37 °C für 1 h.
- Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1).
- Vortexen für 30 sec.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g für 1 min.
- Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß.
- Zugabe von 1 Volumen Chloroform.
- Vortexen für 30 sec.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g für 1 min.
- Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß.
- Zugabe von 1/10 Volumen 5 M Natriumchlorid.
- Zugabe von 2 Volumen reinem Ethanol.
- Inkubieren bei -80 °C für 20 min.
- Zentrifugieren bei 16.000 x g für 10 min.
- Verwerfen des Überstands.
- Zum Waschen des Pellets Übersichten mit 500 μL 75% Ethanol
- Zentrifugieren bei 16.000 x g für 7 min.
- Verwerfen des Überstands.
- Trocknen des Pellets mit Druckluft.
- Lösen der RNA in 30 μL RNase-freiem Wasser.
- Messen der Konzentration und Reinheit (A_{260}/A_{280}) der RNA-Lösung am Photometer (Nanodrop ND-1000).

B.2.2.3.3 cDNA-Synthese

Folgendes Protokoll wurde zur cDNA-Synthese verwendet:

- 2 µL Total-RNA wurden mit 3 µL dNTPs (2 mM) und 3 µL Random Hexamer Primer (100 mM) versetzt und mit Wasser auf 21 µL auffüllen.
- 5 min bei 65 °C inkubieren.
- 1 min auf Eis inkubieren.
- Zugabe von 8 µL M-MLV Reverse Transcriptase 5 x *Reaction Buffer* (Promega) und 1 µL M-MLV Reverse Transcriptase (Promega).
- Inkubation für 60 min bei 42 °C.
- Inaktivierung des Enzyms bei 90 °C für 10 min.

1 µL dieser cDNA wurde als Template für die PCR (Taq-Polymerase) verwendet. Die PCR wurde mit einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C (VEGF-Primer) bzw. 57 °C (GAPDH-Primer) und 35 Zyklen durchgeführt.

B.2.2.4 Nachweis des VEGF165 auf Proteinebene

Die Kulturen wurden in 50 mL Zentrifugiergefäße gefüllt und bei 4000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 2-4 mL 1 x PBS resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde 3 mal 1 min (90 W, 0,6 s Pulsdauer) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und sowohl der Überstand mit der löslichen Fraktion als auch das erhaltene Pellet mit der unlöslichen Fraktion wurden in einer SDS-PAGE untersucht.

B.2.2.5 Aufreinigung

B.2.2.5.1 Kationenaustauschchromatographie (IEX)

- TBS-Puffer: 20 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5
- Puffer A: 50 mM Tris/Cl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM EDTA, 5 Vol.-% Glycerin, 10 µg/mL DNase I (10 mg/L), pH 8,0
- Puffer B: 6 M Harnstoff, 0,1 M DTT, 50 mM MES, pH 5,5
- Puffer B + NaCl: 300 mM NaCl in Puffer B
- Puffer C: 6 M Harnstoff, 0,5 M Cystin, 0,1 M Glycin, 20 mM Hepes, pH 7,4

Vorbereitung der Proben:

50 mL der VEGF-enhaltenen Kulturlösung wurden in Zentrifugiergefäßen abzentrifugiert (15 min, 4000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 20 mL TBS-Puffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -80 °C eingefroren.

Das Pellet wurde bei 37 °C aufgetaut und in 25 mL Puffer A resuspendiert und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellschälung wurde 5-mal je 20 sec mit dem Ultra-Thorax (high speed) behandelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde auf Eis gekühlt und 6-mal für je 15 sec mit Ultraschall (90 W, 0,6 s Pulsdauer) behandelt. Natriumdeoxycholat und NP-40 wurden zugefügt (Endkonzentration 0,05% bzw. 1%) gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei 4 °C. Die Lösung wurde bei 4000 g und 4 °C 1 h lang zentrifugiert. Das Pellet wird in 25 mL Puffer A mit 0,05% Natriumdeoxycholat und 1% NP-40) resuspendiert und erneut für 30 min zentrifugiert bei 4000 g und 4 °C. Die *Inclusion Bodies* wurden bei 4 °C in 25 mL Puffer B resuspendiert. Vor der FPLC-Aufreinigung wurden alle Puffer und die Probe steril filtriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad entgast.

FPLC-Durchführung:

- Equilibrierung der Membran (Sartobind S 75) mit 15 mL Puffer B (2 mL/min)
- 10 mL der Proteinprobe wurde auf Säule geben (1 mL/min)
- Mit Puffer B wurde 15 min gewaschen (2 mL/min)
- Die Proteine wurden in einer Gradientenelution mit Puffer B + NaCl (1 mL/min) eluiert

Die erhaltenen Fraktionen der Elution wurden vereint und einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Anschließend wurden die Lösung mit 2 Volumen Puffer C vermischt und 4 h lang bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zum Falten des VEGF₁₆₅ wurde die Lösung durch Zugabe von PBS mit 50 mM Glycin zu einer Endkonzentration an Harnstoff von 0,3 M verdünnt. Das VEGF wurde mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und 5-mal mit 1 x PBS gewaschen.

B.2.2.5.2 Heparin-Affinitätschromatographie

- Bindungspuffer: 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0
- Elutionspuffer: 10 mM Natriumphosphat, 2 M NaCl, pH 7,0

Vorbereitung der Proben:

50 mL der VEGF-Kulturen wurden in Zentrifugiergefäßen abzentrifugiert (15 min, 4000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 4 mL 20 mM Tris-HCl und 5 mM EDTA suspendiert. Die Lösung wurde auf Eis gekühlt und 3-mal für je 1 min mit Ultraschall (90 W, 0,6 s Pulsdauer) behandelt. Die aufgeschlossenen Zellen wurde bei 4000 g und 4 °C für 15 min abzenrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde 1-mal mit 4 mL 20 mM Tris-HCl und 5 mM EDTA gewaschen. Die *Inclusion Bodies* wurden in 4 mL 7,5 M Harnstoff-Lösung gelöst und 10-fach verdünnt mit 20 mM Tris-HCl, 7 µM CuCl₂, pH 8,4. Die Lösung wurde anschließend über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

FPLC-Durchführung:

- Equilibrierung der Membran mit 10 mL Bindungspuffer (1 mL/min)
- 10 mL der Proteinprobe wurde auf die Säule (HiTrap™ Heparin HP Column) geben (0,5 mL/min)
- Waschen mit 10 mL Bindungspuffer (1 mL/min)
- Gradientenelution mit 15 mL Elutionspuffer (0,5 mL/min)
- Spülen mit 10 mL Bindungspuffer (1 mL/min)

Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden vereint und der Aufreinigungserfolg mit SDS-PAGE-Analyse kontrolliert.

B.2.2.5.3 Affinitätsaufreinigung über S•Tag

Die Aufreinigung des VEGF₁₆₅-S•Tag wurde mit dem S•Tag™ Thrombin Purification Kit (Merck, KgaA, Darmstadt, DE) durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben sowie die Durchführung wurden nach Gebrauchsanweisung durchgeführt.

B.3 Herstellung der Microarray-Oberflächen

Die Herstellung der verschieden funktionalisierten Oberflächen fand auf unmodifizierten Glasobjektträgern statt. Als Reaktionsgefäß wurden einfache Glasschalen verwendet, alle Schritte wurden im Abzug auf dem Schüttler durchgeführt.

B.3.1 Aminofunktionalisierte Oberflächen

Die Glasobjektträger wurden in 1 M NaOH für 12 h inkubiert und anschließend für 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Mit 1 M HCl wurde 5 min lang neutralisiert und die Slides erneut 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die Slides 5 min mit Methanol gewaschen und in eine 3%ige Aminopropyltrimethoxysilan-Lösung in 95% Methanol gegeben. Die Reaktion fand mithilfe von Ultraschall bei 50 °C für 5 min statt. Mit reinem Methanol sowie Reinstwasser wurden die Chips je 5 min gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Zuletzt wurden die Slides bei 110 °C für 30 min gebacken.

B.3.2 Epoxyfunktionalisierte Oberflächen

Die Glasobjektträger wurden in 1 M NaOH für 12 h inkubiert und anschließend für 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Mit 1 M HCl wurde 30 min lang neutralisiert und die Slides erneut 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die Slides 5 min mit Reinstwasser und 1 h mit 95% igem Ethanol gewaschen. Die Slides wurden im Stickstoffstrom getrocknet. Die Reaktion fand in einer Lösung 5%iger 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) mithilfe von Ultraschall bei 50 °C für 2 h statt. Die Slides wurden 3-mal 5 min bei Raumtemperatur mit Reinstwasser gewaschen. Nach dem Waschen in Aceton für 5 min wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet.

B.3.3 Aldehydfunktionalisierte Oberflächen

Die Glasobjektträger wurden in 1 M NaOH für 12 h inkubiert und anschließend für 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Mit 1 M HCl wurde 30 min lang neutralisiert und die Slides erneut 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurden die Slides 5 min mit Reinstwasser und 1 h mit 95% igem Ethanol gewaschen. Die Slides wurden im Stickstoffstrom getrocknet. Die Reaktion fand in einer Lösung 5%iger 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) mithilfe von Ultraschall bei 50 °C für 2 h statt. Danach wurden die Oberflächen 3 h in verdünnter HCL (0,2 M) inkubiert und 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Für 1 h wurden sie dann in einer Natriumperiodatlösung (0,1 M) und anschließend 3-mal 5 min mit Reinstwasser

gewaschen. Nach Waschen in Aceton für 5 min, wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet.

B.3.4 Herstellung der aminofunktionalisierten Linker-Systeme

B.3.4.1 Acylierung der Oberflächen

Die aminomodifizierten Glasslides aus Abschnitt B.2.1 wurden nach folgendem Protokoll modifiziert:

- Inkubation für 2 h in einer Lösung aus 81 μL (1 mmol) Acryloylchlorid und 171 μL (1 mmol) Diisopropylethylamin (DIEA) in 30 mL wasserfreiem Dichlorethan.
- Waschen in Dichlorethan für 5 min.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.4.2 Linker-System: kurz

- Die acylierten Slides aus Abschnitt B.2.3.1 wurden für 36 h mit 223 μL (1 mmol) Tetraethylenpentamin in 30 mL wasserfreiem DMF inkubiert.
- 5 min Waschen mit DMF.
- 5 min Waschen mit Methanol.
- 5 min Waschen mit Aceton.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.4.3 Linker-System: mittel

- Die acylierten Slides aus Abschnitt B.2.3.1 wurden für 36 h in 213 μL (1 mmol) 1,4-bis-(3-aminopropoxy)butan und 30 mL DMF inkubiert.
- 5 min Waschen mit DMF.
- 5 min Waschen mit Methanol.
- 5 min Waschen mit Aceton.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.4.4 Linker-System: lang

- Die acylierten Slides aus Abschnitt B.2.3.1 wurden für 36 h in 223 μL (1 mmol) Tetraethylenpentamin und 30 mL DMF inkubiert.
- 5 min Waschen mit DMF.
- 5 min Waschen mit Methanol.
- 5 min Waschen mit Aceton.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.4.5 Aktivierung aminofunktionalisierter Oberflächen mit PDIC

- Die aminomodifizierten Slides wurden für 2 h in einer Lösung aus 1 mmol 1,4-Phenylendiisocyanat (PDIC) mit 4 mL Pyridin (> 99,8%) und 36 mL DMF inkubiert.
- 5 min Waschen mit DMF.
- 5 min Waschen mit Dichlorethan.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.5 Einführung von Epoxygruppen auf aminofunktionalisierten Oberflächen

- Die aminomodifizierten Slides aus Abschnitt B.2.3 wurden für 2 h in einer Lösung aus 1 mmol Diepoxyoctan in 36 mL DMF inkubiert.
- 5 min Waschen mit DMF.
- 5 min Waschen mit Dichlorethan.
- Trocknen im Stickstoffstrom.

B.3.6 Einführung von Aldehydgruppen auf aminofunktionalisierten Oberflächen

- Die aminomodifizierten Slides aus Abschnitt B.2.3 wurden für 2 h in einer Lösung aus 5% Glutaraldehyd in 1 x PBS.
- 3-mal 5 min Waschen mit 1 x PBS.
- 1 min Waschen mit 95% Ethanol.
- Trocknen der Slides im Stickstoffstrom.

B.4 Microarray-Experimente

Für die Immobilisierung der Aptamere bzw. Proteine wurden der Kontakt-Spotter Affymetrix 417 Arrayer sowie der kontaktfreie Spotter NanoPlotter NP 2.1 verwendet (siehe Abschnitt 2.3.1.1 und 2.3.1.1). Zum Immobilisieren wurden die anti his-Tag- und anti VEGF-Aptamere in Ihrem Selektionspuffer und die anti F_c-Aptamere in 1 x PBS verdünnt, die Proteine wurden in 1 x PBS aufgenommen. Nach dem Spotten wurden die mit Aptameren bedruckten Microarrays vor der Verwendung über Nacht im Dunkeln gelagert. Die Microarrays, welche mit Proteinen bedruckt wurden, wurden nach dem Spotten ca. 30 min bei 20 °C inkubiert.

Alle Inkubationen der Slides fanden in Glasschalen auf einem Schüttler bzw. in einem Thermomixer mit Slideaufsatz statt.

B.4.1 Forward-Phase

Im *Forward-Phase*-Format wurden alle Aptamere in verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 150 und 200 µM) mit 5 Hits bzw. im Falle des kontaktfreien Spotters mit 3 Droplets pro Spot auf die Oberflächen gespottet.

B.4.1.1 PEI-Aldehydslides

Zunächst wurden die Aldehydslides mit PEI modifiziert

- Die Slides wurden für 1 h in 200 mL 5% iger Polyethyleniminlösung (PEI) inkubiert.
- Die Chips wurden 2-mal 5 min in 1 x PBS gewaschen.
- Die Oberflächen wurden mit Druckluft getrocknet.

In einem nächsten Schritt wurden die Aptamere an ihrem terminalen Aminolinker aktiviert:

- Das Aptamer (50 nmol) wurde in 450 µL Selektionspuffer gelöst.
- Zu der Aptamerlösung wurden 50 µL Cyanurchlorid (250 nmol) in Acetonitril gegeben und die Mischung 1 h bei 20 °C inkubiert.
- Mit einem Zentrifugalkonzentrator (3 kDa) wurde das Aptamer 10-mal umgepuffert.

Nach der Immobilisierung der Aptamere auf den Microarrays wurden diese wie folgt behandelt:

- Die Slides wurden 5 Minuten in einer Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 mL DMSO und 1 mL 100 mM Natriumhydrogencarbonat (pH 9,4) inkubiert.
- Anschließend wurden die Slides einmal mit Reinstwasser gespült und 2-mal für je 1 min in Reinstwasser gewaschen.
- Die Slides wurden für 30 min in 1% BSA in Selektionspuffer blockiert.
- Anschließend wurden die Slides 5 Minuten mit Selektionspuffer gewaschen.
- Die Microarrays wurden mit kochendem Reinstwasser übergossen und 1 min darin inkubiert.
- Anschließend fand eine Inkubation der Slides für 30 min im Selektionspuffer statt.
- Auf den mit Druckluft getrockneten Slides wurde eine Hybridisierungskammer aufgebracht und mit der zu inkubierenden fluoreszenzmarkierten Proteinlösung (800 μ L, verdünnt in Selektionspuffer) befüllt.
- Die Inkubation fand für 4 h bei Raumtemperatur in einem Thermomixer mit Slideaufsatz bei 300 rpm statt.
- Unter Lichtausschluss wurden die Slides 2-mal für je 5 min im Selektionspuffer gewaschen.
- Vor dem Scannen wurden die Slides mit Druckluft getrocknet.

Für die Detektion des F_C-Fragments und der Immunoglobuline mit den Aptameren 264, 265 und 266 wurde das gleiche Protokoll, jedoch ohne den Denaturierungsschritt verwendet.

B.4.1.2 Epoxy-PEG-Slides

Auf den Epoxy-PEG Slides wurden die Aptamere direkt ohne Aktivierung über ihren terminalen Aminolinker in verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 150 und 200 μ M) immobilisiert, anschließend wurden sie wie folgt behandelt:

- Die Slides wurden für 30 min in 1% BSA in Selektionspuffer blockiert.
- Dann wurden die Slides 5 min mit Selektionspuffer gewaschen.
- Die Microarrays wurden mit kochendem Reinstwasser übergossen und 1 min darin inkubiert.
- Anschließend fand eine Inkubation der Slides für 30 min im Selektionspuffer statt.

- Auf den mit Druckluft getrockneten Slides wurde eine Hybridisierungskammer aufgebracht und mit der fluoreszenzmarkierten Proteinlösung (800 μ L, verdünnt in Selektionspuffer) befüllt.
- Die Inkubation fand für 4 h bei Raumtemperatur in einem Thermomixer mit Slideaufsatz bei 300 rpm statt.
- Unter Lichtausschluss wurden die Slides 2-mal für je 5 min im Selektionspuffer gewaschen.
- Vor dem Scannen wurden die Slides mit Druckluft getrocknet.

Für die Detektion des F_C-Fragments und der Immunoglobuline mit den Aptameren 264, 265 und 266 wurde das gleiche Protokoll, jedoch ohne den Denaturierungsschritt verwendet.

B.4.1.3 Nachweis der gebundenen Aptamere mit SYBR Green

- Die Slides wurden 15 min lang in einer Lösung aus SYBR Green I und II (1:1-Mischung) in Reinstwasser (1:10000) inkubiert.
- Anschließend wurden die Slides 2-mal 5 min in Reinstwasser gewaschen.
- Vor dem Scannen wurden die Slides mit Druckluft getrocknet.

B.4.2 Reverse-Phase

Im *Reverse-Phase*-Format wurden alle Proteine mit 8 Hits bzw. im Falle des kontaktfreien Spotters mit 8 Tropfen pro Spot auf die Oberflächen gespottet. Die Immobilisierung der zu detektierenden Proteine fand dabei auf Aldehydslides oder Nitrocelluloseslides statt.

B.4.2.1 Detektion mit anti His-Tag- und anti F_C-Fragment-Aptameren

- Die Slides wurden nach dem Spotten für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Slides wurden 45 min lang mit 1% BSA in 1 x PBS blockiert.
- Anschließend wurden die Microarrays 5 min in 1 x PBS und 2-mal 1 min in Reinstwasser gewaschen.
- Die Hybridisierungskammer wurde auf die Slides gesetzt und mit fluoreszenzmarkierter Aptamerlösung befüllt.

- Die Slides wurden bei Raumtemperatur und 300 rpm in einem Thermomixer mit Slideaufsatz über Nacht inkubiert.
- Die Slides werden 2-mal 5 min mit Selektionspuffer gewaschen.
- Vor dem Scannen werden die Slides mit Druckluft getrocknet.

B.4.2.2 Detektion mit anti VEGF₁₆₅-Aptameren

Die Detektion von VEGF₁₆₅ im *Reverse-Phase*-Format wurde analog zu dem Protokoll in Abschnitt B.3.2.1 durchgeführt. Zu dem Selektionspuffer wurde jedoch zusätzlich 50 mM KCl gegeben.

B.4.3 Sandwich

Im Sandwich-Format wurden die Aptamere zunächst analog zu dem Protokoll des *Forward-Phase*-Formats in Abschnitt B.3.1.1 aktiviert und auf PEI-Aldehydslides in verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 150 µM) immobilisiert.

B.4.3.1 Detektion von humanem F_C-Fragment und Immunoglobulinen

- Die Slides wurden 5 Minuten in einer Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 mL DMSO und 1 mL 100 mM Natriumhydrogencarbonat (pH 9,4) inkubiert.
- Anschließend wurden die Slides einmal mit Reinstwasser gespült und 2-mal für je 1 min in Reinstwasser gewaschen.
- Die Slides wurden für 30 min in 1% BSA in Selektionspuffer blockiert.
- Anschließend wurden die Slides 10 Minuten mit Selektionspuffer gewaschen.
- Auf den mit Druckluft getrockneten Slides wurde eine Hybridisierungskammer aufgebracht und mit der Proteinlösung (800 µL, verdünnt in Selektionspuffer) befüllt.
- Die Inkubation fand für 1,5 h bei Raumtemperatur in einem Thermomixer mit Slideaufsatz bei 300 rpm statt.
- Die Slides wurden 2-mal für je 10 min im Selektionspuffer gewaschen.
- Die Slides wurden mit Druckluft getrocknet und erneut mit einer Hybridisierungskammer versehen, welche mit fluoreszenzmarkierter Aptamerlösung (15 µg/mL) befüllt wurde.

- Die Inkubation der Slides mit der Detektionslösung fand für 2 h bei 300 rpm im Thermomixer mit Slideaufsatz statt.
- Anschließend wurden die Slides unter Lichtausschluss 2-mal je 10 min in Selektionspuffer gewaschen.
- Vor dem Scannen wurden die Slides mit Druckluft getrocknet.

C Abkürzungsverzeichnis

Bgl	β-Glucanase
BM	<i>Background Mean</i>
bp	<i>base pair(s)</i>
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Cy3	Indocarbocyanin
DEO	1,2,7,8-Diepoxyoctan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
D/P-Ratio	<i>Dye to Protein Ratio</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
HEG	Hexaethylenglycol
IgG	Immunoglobulin G
IMAC	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDIC	1,4-Phenylendiisocyanat
PDITC	Phenylendiisothiocyana
PFEI	<i>Pseudomonas Fluorescens Esterase I</i>
PQQ-GDH	Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i>
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PSMA	prostata-spezifisches Membranantigen
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i>
SM	<i>Signal Mean</i>
SNR	<i>Signal-to-Noise-Ratio</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

D Literaturverzeichnis

- [1] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis *et al.*, "Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns with a Complementary-DNA Microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467-470, Oct 20, 1995.
- [2] M. Schena, D. Shalon, R. Heller *et al.*, "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 20, pp. 10614-10619, Oct 1, 1996.
- [3] D. S. Wilson, and S. Nock, "Functional protein microarrays," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 6, no. 1, pp. 81-5, Feb, 2002.
- [4] L. T. Yin, C. Y. Hu, and C. H. Chang, "A single layer nitrocellulose substrate for fabricating protein chips," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 130, no. 1, pp. 374-378, Mar 14, 2008.
- [5] J. G. Walter, F. Stahl, M. Reck *et al.*, "Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD," *Engineering in Life Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 103-108, Apr, 2010.
- [6] V. I. Dyukova, E. I. Dementieva, D. A. Zubtsov *et al.*, "Hydrogel glycan microarrays," *Anal Biochem*, vol. 347, no. 1, pp. 94-105, Dec 1, 2005.
- [7] Y. Zhou, O. Andersson, P. Lindberg *et al.*, "Protein microarrays on carboxymethylated dextran hydrogels: Immobilization, characterization and application," *Microchimica Acta*, vol. 147, no. 1-2, pp. 21-30, Jun, 2004.
- [8] P. Mitchell, "A perspective on protein microarrays," *Nat Biotechnol*, vol. 20, no. 3, pp. 225-9, Mar, 2002.
- [9] J. G. Walter, O. Kokpinar, K. Friehs *et al.*, "Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein-microarray applications," *Anal Chem*, vol. 80, no. 19, pp. 7372-8, Oct 1, 2008.
- [10] Y. H. Lao, K. Peck, and L. C. Chen, "Enhancement of Aptamer Microarray Sensitivity through Spacer Optimization and Avidity Effect," *Anal Chem*, Feb 4, 2009.
- [11] J. R. Collett, E. J. Cho, and A. D. Ellington, "Production and processing of aptamer microarrays," *Methods*, vol. 37, no. 1, pp. 4-15, Sep, 2005.
- [12] E. J. Cho, J. R. Collett, A. E. Szafranska *et al.*, "Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets," *Anal Chim Acta*, vol. 564, no. 1, pp. 82-90, Mar 30, 2006.
- [13] K. Jaras, A. Ressine, E. Nilsson *et al.*, "Reverse-phase versus sandwich antibody microarray, technical comparison from a clinical perspective," *Anal Chem*, vol. 79, no. 15, pp. 5817-25, Aug 1, 2007.
- [14] U. B. Nielsen, and B. H. Geierstanger, "Multiplexed sandwich assays in microarray format," *J Immunol Methods*, vol. 290, no. 1-2, pp. 107-20, Jul, 2004.

- [15] J. L. Chavez, W. Lyon, N. Kelley-Loughnane *et al.*, "Theophylline detection using an aptamer and DNA-gold nanoparticle conjugates," *Biosens Bioelectron*, vol. 26, no. 1, pp. 23-8, Sep 15.
- [16] T. Mairal, V. C. Ozalp, P. Lozano Sanchez *et al.*, "Aptamers: molecular tools for analytical applications," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 4, pp. 989-1007, Feb, 2008.
- [17] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, and B. A. Sullenger, "Aptamers: an emerging class of therapeutics," *Annu Rev Med*, vol. 56, pp. 555-83, 2005.
- [18] D. Proske, M. Blank, R. Buhmann *et al.*, "Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 69, no. 4, pp. 367-74, Dec, 2005.
- [19] Y. Li, and Y. Lu, *Functional nucleic acids for analytical applications*, New York, N.Y.: Springer, 2009.
- [20] F. Duconge, and J. J. Toulme, "In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1," *RNA*, vol. 5, no. 12, pp. 1605-14, Dec, 1999.
- [21] J. C. Cox, P. Rudolph, and A. D. Ellington, "Automated RNA selection," *Biotechnol Prog*, vol. 14, no. 6, pp. 845-50, Nov-Dec, 1998.
- [22] L. R. Paborsky, S. N. McCurdy, L. C. Griffin *et al.*, "The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin," *J Biol Chem*, vol. 268, no. 28, pp. 20808-11, Oct 5, 1993.
- [23] S. D. Mendonsa, and M. T. Bowser, "In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis," *Anal Chem*, vol. 76, no. 18, pp. 5387-92, Sep 15, 2004.
- [24] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg *et al.*, "In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 338, no. 4, pp. 1928-34, Dec 30, 2005.
- [25] J. Kawakami, H. Imanaka, Y. Yokota *et al.*, "In vitro selection of aptamers that act with Zn²⁺," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 82, no. 1-4, pp. 197-206, Nov, 2000.
- [26] D. Faulhammer, and M. Famulok, "Characterization and divalent metal-ion dependence of in vitro selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides," *J Mol Biol*, vol. 269, no. 2, pp. 188-202, Jun 6, 1997.
- [27] C. Wang, M. Zhang, G. Yang *et al.*, "Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment," *J Biotechnol*, vol. 102, no. 1, pp. 15-22, Apr 10, 2003.
- [28] C. L. A. Hamula, H. Q. Zhang, L. L. Guan *et al.*, "Selection of aptamers against live bacterial cells," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 20, pp. 7812-7819, Oct 15, 2008.
- [29] I. Tinoco, and C. Bustamante, "How RNA folds," *Journal of Molecular Biology*, vol. 293, no. 2, pp. 271-281, Oct 22, 1999.
- [30] P. Brion, and E. Westhof, "Hierarchy and dynamics of RNA folding," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 26, pp. 113-137, 1997.

- [31] J. R. Wyatt, J. D. Puglisi, and I. Tinoco, "Rna Folding - Pseudoknots, Loops and Bulges," *Bioessays*, vol. 11, no. 4, pp. 100-106, Oct, 1989.
- [32] D. Lambert, D. Leipply, R. Shiman *et al.*, "The Influence of Monovalent Cation Size on the Stability of RNA Tertiary Structures," *Journal of Molecular Biology*, vol. 390, no. 4, pp. 791-804, Jul 24, 2009.
- [33] R. S. Gregorian, Jr., and D. M. Crothers, "Determinants of RNA hairpin loop-loop complex stability," *J Mol Biol*, vol. 248, no. 5, pp. 968-84, May 19, 1995.
- [34] Y. Nonaka, K. Sode, and K. Ikebukuro, "Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer," *Molecules*, vol. 15, no. 1, pp. 215-25.
- [35] D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker *et al.*, "Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure," *Journal of Molecular Biology*, vol. 288, no. 5, pp. 911-940, May 21, 1999.
- [36] M. Zuker, D. H. Mathews, and D. H. Turner, "Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide.," *Rna Biochemistry and Biotechnology*, vol. 70, pp. 11-43, 1999.
- [37] M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no. 13, pp. 3406-15, Jul 1, 2003.
- [38] T. Sakamoto, A. Oguro, G. Kawai *et al.*, "NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 2, pp. 745-754, 2005.
- [39] E. Westhof, and V. Fritsch, "RNA folding: beyond Watson-Crick pairs," *Structure*, vol. 8, no. 3, pp. R55-R65, Mar 15, 2000.
- [40] T. Hermann, and D. J. Patel, "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers," *Science*, vol. 287, no. 5454, pp. 820-5, Feb 4, 2000.
- [41] S. Uehara, N. Shimada, Y. Takeda *et al.*, "3' Poly(dA)-Tailed Thrombin DNA Aptamer to Increase DNase-Resistance and Clotting Inhibitory Activity," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 81, no. 11, pp. 1485-1491, Nov 15, 2008.
- [42] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith *et al.*, "Thrombin-Binding DNA Aptamer Forms a Unimolecular Quadruplex Structure in Solution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 8, pp. 3745-3749, Apr 15, 1993.
- [43] P. Schultze, R. F. Macaya, and J. Feigon, "Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG)," *J Mol Biol*, vol. 235, no. 5, pp. 1532-47, Feb 4, 1994.
- [44] T. Hermann, and D. J. Patel, "Biochemistry - Adaptive recognition by nucleic acid aptamers," *Science*, vol. 287, no. 5454, pp. 820-825, Feb 4, 2000.
- [45] P. S. Pendergrast, H. N. Marsh, D. Grate *et al.*, "Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications," *J Biomol Tech*, vol. 16, no. 3, pp. 224-34, Sep, 2005.

- [46] L. R. Paborsky, S. N. Mccurdy, L. C. Griffin *et al.*, "The Single-Stranded-DNA Aptamer Binding-Site of Human Thrombin," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 69, no. 6, pp. 889-889, Jun 30, 1993.
- [47] G. L. Conn, and D. E. Draper, "RNA structure," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 278-285, Jun, 1998.
- [48] G. R. Zimmermann, C. L. Wick, T. P. Shields *et al.*, "Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer," *RNA*, vol. 6, no. 5, pp. 659-67, May, 2000.
- [49] N. Hamaguchi, A. Ellington, and M. Stanton, "Aptamer beacons for the direct detection of proteins," *Anal Biochem*, vol. 294, no. 2, pp. 126-31, Jul 15, 2001.
- [50] N. Tuleuova, C. N. Jones, J. Yan *et al.*, "Development of an aptamer beacon for detection of interferon-gamma," *Anal Chem*, vol. 82, no. 5, pp. 1851-7, Mar 1.
- [51] J. R. Williamson, "Induced fit in RNA-protein recognition," *Nat Struct Biol*, vol. 7, no. 10, pp. 834-7, Oct, 2000.
- [52] Y. Li, Y. Lu, "Functional Nucleic Acids for Analytical Applications," New York: Springer Science+Buisness Media, 2009.
- [53] R. D. Jenison, S. D. Jennings, D. W. Walker *et al.*, "Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion," *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, vol. 8, no. 4, pp. 265-79, Aug, 1998.
- [54] K. Ikebukuro, Y. Okumura, K. Sumikura *et al.*, "A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. 12, pp. -, 2005.
- [55] D. O'Connell, A. Koenig, S. Jennings *et al.*, "Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 12, pp. 5883-7, Jun 11, 1996.
- [56] M. F. Kubik, C. Bell, T. Fitzwater *et al.*, "Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding," *J Immunol*, vol. 159, no. 1, pp. 259-67, Jul 1, 1997.
- [57] T. W. Wiegand, P. B. Williams, S. C. Dreskin *et al.*, "High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I," *J Immunol*, vol. 157, no. 1, pp. 221-30, Jul 1, 1996.
- [58] M. Famulok, G. Mayer, and M. Blind, "Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo," *Acc Chem Res*, vol. 33, no. 9, pp. 591-9, Sep, 2000.
- [59] N. C. Pagratis, C. Bell, Y. F. Chang *et al.*, "Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor," *Nat Biotechnol*, vol. 15, no. 1, pp. 68-73, Jan, 1997.
- [60] F. H. Arnold, and H. W. Blanch, "Analytical affinity chromatography. II. Rate theory and the measurement of biological binding kinetics," *J Chromatogr*, vol. 355, no. 1, pp. 13-27, Mar 14, 1986.

- [61] C. Wilson, J. Nix, and J. Szostak, "Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot," *Biochemistry*, vol. 37, no. 41, pp. 14410-9, Oct 13, 1998.
- [62] A. E. Agbarakwe, H. Griffiths, N. Begg *et al.*, "Avidity of Specific Igg Antibodies Elicited by Immunization against Haemophilus-Influenzae Type-B," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 48, no. 3, pp. 206-209, Mar, 1995.
- [63] J. J. Gray, "Avidity of Ebv Vca-Specific Igg Antibodies - Distinction between Recent Primary Infection, Past Infection and Reactivation," *Journal of Virological Methods*, vol. 52, no. 1-2, pp. 95-104, Mar, 1995.
- [64] H. Hasegawa, K. I. Taira, K. Sode *et al.*, "Improvement of aptamer affinity by dimerization," *Sensors*, vol. 8, no. 2, pp. 1090-1098, Feb, 2008.
- [65] C. Tuerk, and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science*, vol. 249, no. 4968, pp. 505-10, Aug 3, 1990.
- [66] A. D. Ellington, and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands," *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818-22, Aug 30, 1990.
- [67] D. S. Wilson, and J. W. Szostak, "In vitro selection of functional nucleic acids," *Annu Rev Biochem*, vol. 68, pp. 611-47, 1999.
- [68] S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi *et al.*, "Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein," *Bioelectrochemistry*, vol. 67, no. 2, pp. 135-41, Oct, 2005.
- [69] K. M. You, S. H. Lee, A. Im *et al.*, "Aptamers as functional nucleic acids: In vitro selection and biotechnological applications," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 8, no. 2, pp. 64-75, Mar-Apr, 2003.
- [70] L. Gold, "Oligonucleotides as Research, Diagnostic, and Therapeutic Agents," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 23, pp. 13581-13584, Jun 9, 1995.
- [71] S. D. Jayasena, "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics," *Clin Chem*, vol. 45, no. 9, pp. 1628-50, Sep, 1999.
- [72] S. C. B. Gopinath, "Methods developed for SELEX," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 387, no. 1, pp. 171-182, Jan, 2007.
- [73] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands," *Biomolecular Engineering*, vol. 24, no. 4, pp. 381-403, Oct, 2007.
- [74] S. Jeong, S. R. Han, Y. J. Lee *et al.*, "Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen," *Biotechnology Letters*, vol. 32, no. 3, pp. 379-385, Mar, 2010.
- [75] M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer *et al.*, "Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels - Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 19, pp. 16464-16468, May 11, 2001.

- [76] A. A. Haller, and P. Sarnow, "In vitro selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 16, pp. 8521-8526, Aug 5, 1997.
- [77] A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner *et al.*, "Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 21, pp. -, Nov 1, 2003.
- [78] A. Nitsche, A. Kurth, A. Dunkhorst *et al.*, "One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX," *BMC Biotechnol*, vol. 7, pp. 48, 2007.
- [79] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 383, no. 1, pp. 83-91, Sep, 2005.
- [80] Y. S. Kim, C. J. Hyun, I. A. Kim *et al.*, "Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen," *Bioorg Med Chem*, vol. 18, no. 10, pp. 3467-73, May 15.
- [81] K. Sefah, J. A. Phillips, X. L. Xiong *et al.*, "Nucleic acid aptamers for biosensors and bioanalytical applications," *Analyst*, vol. 134, no. 9, pp. 1765-1775, 2009.
- [82] E. Torres-Chavolla, and E. C. Alocilja, "Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 24, no. 11, pp. 3175-3182, Jul 15, 2009.
- [83] K. W. Thiel, and P. H. Giangrande, "Therapeutic Applications of DNA and RNA Aptamers," *Oligonucleotides*, vol. 19, no. 3, pp. 209-222, Sep, 2009.
- [84] L. Cerchia, P. H. Giangrande, J. O. McNamara *et al.*, "Cell-specific aptamers for targeted therapies," *Methods Mol Biol*, vol. 535, pp. 59-78, 2009.
- [85] D. F. Martin, M. Klein, J. Haller *et al.*, "Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration," *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, vol. 22, no. 2, pp. 143-152, Apr, 2002.
- [86] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson *et al.*, "An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 18, pp. -, Sep 15, 2003.
- [87] T. S. Romig, C. Bell, and D. W. Drolet, "Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification," *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 731, no. 2, pp. 275-284, Aug 20, 1999.
- [88] X. Wang, Y. Zhang, C. Cheng *et al.*, "Glucose in human serum determined by capillary electrophoresis with glucose micro-biosensor," *Analyst*, Feb 28.
- [89] M. H. de Keijzer, R. W. Brandts, and P. G. Brans, "Evaluation of a biosensor for the measurement of lactate in whole blood," *Clin Biochem*, vol. 32, no. 2, pp. 109-12, Mar, 1999.
- [90] P. D. Skottrup, M. Nicolaisen, and A. F. Justesen, "Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors," *Biosens Bioelectron*, vol. 24, no. 3, pp. 339-48, Nov 15, 2008.

- [91] B. Hock, "Antibodies for immunosensors - A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 347, no. 1-2, pp. 177-186, Jul 30, 1997.
- [92] P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard *et al.*, "Antibody production, design and use for biosensor-based applications," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 10-26, Feb, 2009.
- [93] E. J. Cho, J. W. Lee, and A. D. Ellington, "Applications of Aptamers as Sensors," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 2, pp. 241-264, 2009.
- [94] M. Lee, and D. R. Walt, "A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors," *Anal Biochem*, vol. 282, no. 1, pp. 142-6, Jun 15, 2000.
- [95] J. G. Walter, S. Petersen, F. Stahl *et al.*, "Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers," *J Nanobiotechnology*, vol. 8, pp. 21.
- [96] N. J. Wittenberg, and C. L. Haynes, "Using nanoparticles to push the limits of detection," *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 1, no. 2, pp. 237-254, Mar-Apr, 2009.
- [97] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, "Colorimetric biosensors based on DNA-nanoparticle conjugates," *Anal Sci*, vol. 23, no. 1, pp. 17-20, Jan, 2007.
- [98] J. G. Walter, S. Petersen, F. Stahl *et al.*, "Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers," *J Nanobiotechnology*, vol. 8, pp. 21.
- [99] R. Yamamoto, T. Baba, and P. K. R. Kumar, "Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. (vol 5, pg 389, 2000)," *Genes to Cells*, vol. 5, no. 6, pp. 523-523, Jun, 2000.
- [100] J. J. Li, X. Fang, S. M. Schuster *et al.*, "Molecular Beacons: A Novel Approach to Detect Protein - DNA Interactions This work was partially supported by a U.S. NSF Career Award (CHE-9733650) and by a U.S. Office of Naval Research Young Investigator Award (N00014-98-1-0621)," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 39, no. 6, pp. 1049-1052, Mar, 2000.
- [101] S. Tombelli, A. Minunni, E. Luzzi *et al.*, "Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein," *Bioelectrochemistry*, vol. 67, no. 2, pp. 135-141, Oct, 2005.
- [102] E. Baldrich, A. Restrepo, and C. K. O'Sullivan, "Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance," *Anal Chem*, vol. 76, no. 23, pp. 7053-63, Dec 1, 2004.
- [103] Z. Wang, T. Wilkop, D. Xu *et al.*, "Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer-protein interactions with PDMS microfluidic chips," *Anal Bioanal Chem*, vol. 389, no. 3, pp. 819-25, Oct, 2007.
- [104] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, "Analytical applications of aptamers," *Biosens Bioelectron*, vol. 20, no. 12, pp. 2424-34, Jun 15, 2005.

- [105] A. J. Baeumner, K. A. Edwards, and Y. Wang, "Aptamer sandwich assays: human alpha-thrombin detection using liposome enhancement," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, no. 6, pp. 2645-2654, Dec, 2010.
- [106] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, and K. Sode, "Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 20, no. 10, pp. 2168-2172, Apr 15, 2005.
- [107] S. P. Song, L. H. Wang, J. Li *et al.*, "Aptamer-based biosensors," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, no. 2, pp. 108-117, Feb, 2008.
- [108] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, "Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices," *Methods*, vol. 37, no. 1, pp. 48-56, Sep, 2005.
- [109] C. R. Suri, M. Raje, and G. C. Varshney, "Immunosensors for pesticide analysis: Antibody production and sensor development," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 22, no. 1, pp. 15-32, 2002.
- [110] S. Laurenson, M. R. Pett, K. Hoppe-Seyler *et al.*, "Development of peptide aptamer microarrays for detection of HPV16 oncoproteins in cell extracts," *Analytical Biochemistry*, vol. 410, no. 2, pp. 161-170, Mar 15, 2011.
- [111] S. Y. Seong, and C. Y. Choi, "Current status of protein chip development in terms of fabrication and application," *Proteomics*, vol. 3, no. 11, pp. 2176-2189, Nov, 2003.
- [112] B. B. Haab, "Methods and applications of antibody microarrays in cancer research," *Proteomics*, vol. 3, no. 11, pp. 2116-2122, Nov, 2003.
- [113] M. Reck, F. Stahl, J. G. Walter *et al.*, "Optimization of a microarray sandwich-ELISA against hINF-gamma on a modified nitrocellulose membrane," *Biotechnology Progress*, vol. 23, no. 6, pp. 1498-1505, Nov-Dec, 2007.
- [114] S. Ray, G. Mehta, and S. Srivastava, "Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges," *Proteomics*, vol. 10, no. 4, pp. 731-748, Feb, 2010.
- [115] J. LaBaer, and N. Ramachandran, "Protein microarrays as tools for functional proteomics," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 14-19, Feb, 2005.
- [116] X. B. Yu, D. K. Xu, and Q. Cheng, "Label-free detection methods for protein microarrays," *Proteomics*, vol. 6, no. 20, pp. 5493-5503, Oct, 2006.
- [117] C. P. Paweletz, L. Charboneau, V. E. Bichsel *et al.*, "Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front," *Oncogene*, vol. 20, no. 16, pp. 1981-1989, Apr 12, 2001.
- [118] J. D. Wulfkuhle, J. A. Aquino, V. S. Calvert *et al.*, "Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays," *Proteomics*, vol. 3, no. 11, pp. 2085-2090, Nov, 2003.
- [119] M. Beier, and J. D. Hoheisel, "Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips," *Nucleic Acids Res*, vol. 27, no. 9, pp. 1970-7, May 1, 1999.

- [120] W. Kusnezow, and J. D. Hoheisel, "Solid supports for microarray immunoassays," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 16, no. 4, pp. 165-176, Jul-Aug, 2003.
- [121] D. Sethi, R. P. Gandhi, P. Kuma *et al.*, "Chemical strategies for immobilization of oligonucleotides," *Biotechnol J*, vol. 4, no. 11, pp. 1513-29, Nov, 2009.
- [122] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper *et al.*, "Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 4, pp. 1009-21, Feb, 2008.
- [123] A. Y. Rubina, V. I. Dyukova, E. I. Dementieva *et al.*, "Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips," *Anal Biochem*, vol. 340, no. 2, pp. 317-29, May 15, 2005.
- [124] T. Kukar, S. Eckenrode, Y. R. Gu *et al.*, "Protein microarrays to detect protein-protein interactions using red and green fluorescent proteins," *Analytical Biochemistry*, vol. 306, no. 1, pp. 50-54, Jul 1, 2002.
- [125] J.-G. S. Walter, F.; Reck, M.; Praulich, I, "Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD," *Engineering in Life Sciences*, vol. 10, no. 2, 2010.
- [126] J. L. Tonkinson, and B. A. Stillman, "Nitrocellulose: A tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate," *Frontiers in Bioscience*, vol. 7, pp. C1-C12, Jan, 2002.
- [127] K. Stadtherr, H. Wolf, and P. Lindner, "An aptamer-based protein biochip," *Anal Chem*, vol. 77, no. 11, pp. 3437-43, Jun 1, 2005.
- [128] C. Roh, H. Y. Lee, S. E. Kim *et al.*, "Quantum-dots-based detection of hepatitis C virus (HCV) NS3 using RNA aptamer on chip," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 85, no. 8, pp. 1130-1134, Aug, 2010.
- [129] R. Yamamoto-Fujita, and P. K. Kumar, "Aptamer-derived nucleic acid oligos: applications to develop nucleic acid chips to analyze proteins and small ligands," *Anal Chem*, vol. 77, no. 17, pp. 5460-6, Sep 1, 2005.
- [130] J. R. Collett, E. J. Cho, J. F. Lee *et al.*, "Functional RNA microarrays for high-throughput screening of anti-protein aptamers," *Anal Biochem*, vol. 338, no. 1, pp. 113-23, Mar 1, 2005.
- [131] C. Bock, M. Coleman, B. Collins *et al.*, "Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis," *Proteomics*, vol. 4, no. 3, pp. 609-18, Mar, 2004.
- [132] O. Kokpinar, J. G. Walter, Y. Shoham *et al.*, "Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads," *Biotechnol Bioeng*, May 2.
- [133] N. O. Fischer, and T. M. Tarasow, "Identification and optimization of DNA aptamer binding regions using DNA microarrays," *Methods Mol Biol*, vol. 723, pp. 57-66.
- [134] M. Platt, W. Rowe, J. Knowles *et al.*, "Analysis of aptamer sequence activity relationships," *Integr Biol (Camb)*, vol. 1, no. 1, pp. 116-22, Jan, 2009.
- [135] M. B. Doyle, S.A. Murphy, "Aptamers and methods for their *in vitro* selection and uses thereof," *Patent application publication*, vol. US2005/0142582 A1, 2005.

- [136] O. Kikin, L. D'Antonio, and P. S. Bagga, "QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences," *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no. Web Server issue, pp. W676-82, Jul 1, 2006.
- [137] J. Walter, "Neue Materialien und Methoden in der Protein-Microarray-Technologie," Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2008.
- [138] I. M. B. Roitt, Jonathan; Male, David K., *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*: Stuttgart, Thieme, 1991.
- [139] Y. A. Muller, H. W. Christinger, B. A. Keyt *et al.*, "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 angstrom resolution: multiple copy flexibility and receptor binding," *Structure*, vol. 5, no. 10, pp. 1325-1338, Oct 15, 1997.
- [140] X. Zhang, A. S. R. Potty, G. W. Jackson *et al.*, "Engineered 5S ribosomal RNAs displaying aptamers recognizing vascular endothelial growth factor and malachite green," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 22, no. 2, pp. 154-161, Mar-Apr, 2009.
- [141] A. S. R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang *et al.*, "Biophysical Characterization of DNA Aptamer Interactions with Vascular Endothelial Growth Factor," *Biopolymers*, vol. 91, no. 2, pp. 145-156, Feb, 2009.
- [142] P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva *et al.*, "Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF," *Chem Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 25-33, Jan, 2005.
- [143] G. Querques, F. Prascina, C. Iaculli *et al.*, "Intravitreal pegaptanib sodium (Macugen) for refractory cystoid macular edema in pericentral retinitis pigmentosa," *Int Ophthalmol*, vol. 29, no. 2, pp. 103-7, Apr, 2009.
- [144] D. H. Bunka, O. Platonova, and P. G. Stockley, "Development of aptamer therapeutics," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 10, no. 5, pp. 557-62, Oct.
- [145] Z. Ni, and P. Hui, "Emerging pharmacologic therapies for wet age-related macular degeneration," *Ophthalmologica*, vol. 223, no. 6, pp. 401-10, 2009.
- [146] R. Cressey, O. Wattananupong, N. Lertprasertsuke *et al.*, "Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis," *BMC Cancer*, vol. 5, pp. 128, 2005.
- [147] R. T. Raines, M. McCormick, T. R. Van Oosbree *et al.*, "The S.Tag fusion system for protein purification," *Methods Enzymol*, vol. 326, pp. 362-76, 2000.
- [148] R. R. Kopito, "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation," *Trends Cell Biol*, vol. 10, no. 12, pp. 524-30, Dec, 2000.
- [149] C. Heiring, and Y. A. Muller, "Folding screening assayed by proteolysis: application to various cystine deletion mutants of vascular endothelial growth factor," *Protein Eng*, vol. 14, no. 3, pp. 183-8, Mar, 2001.
- [150] G. Siemeister, B. Schnurr, K. Mohrs *et al.*, "Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 222, no. 2, pp. 249-55, May 15, 1996.

- [151] S. Tugues, S. Koch, L. Gualandi *et al.*, “Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer,” *Mol Aspects Med*, vol. 32, no. 2, pp. 88-111, Apr.
- [152] M. E. Stauffer, N. J. Skelton, and W. J. Fairbrother, “Refinement of the solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor using residual dipolar couplings,” *Journal of Biomolecular Nmr*, vol. 23, no. 1, pp. 57-61, May, 2002.
- [153] F. U. Hartl, and M. Hayer-Hartl, “Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 574-581, Jun, 2009.
- [154] J. F. Kane, and D. L. Hartley, “Formation of Recombinant Protein Inclusion-Bodies in Escherichia-Coli,” *Trends in Biotechnology*, vol. 6, no. 5, pp. 95-101, May, 1988.
- [155] C. Preininger, U. Sauer, J. Dayteg *et al.*, “Optimizing processing parameters for signal enhancement of oligonucleotide and protein arrays on ARChip Epoxy,” *Bioelectrochemistry*, vol. 67, no. 2, pp. 155-62, Oct, 2005.
- [156] M. K. McQuain, K. Seale, J. Peek *et al.*, “Effects of relative humidity and buffer additives on the contact printing of microarrays by quill pins,” *Anal Biochem*, vol. 320, no. 2, pp. 281-91, Sep 15, 2003.
- [157] D. H. Verdnick, S.; Pickett, S., , “Key considerations for accurate microarray scanning and image analysis,” *DNA image analysis:nuts and bolts; Kamberova, G., Ed.; DNA Press: Salem, MA*, 2002.
- [158] C. Mircean, I. Shmulevich, D. Cogdell *et al.*, “Robust estimation of protein expression ratios with lysate microarray technology,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 1935-42, May 1, 2005.
- [159] T. I. Pristoupil, M. Kramlova, and J. Sterbikova, “On the mechanism of adsorption of proteins to nitrocellulose in membrane chromatography,” *J Chromatogr*, vol. 42, no. 3, pp. 367-75, Jul, 1969.
- [160] A. J. Baeumner, and K. A. Edwards, “Aptamer sandwich assays: label-free and fluorescence investigations of heterogeneous binding events,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, no. 6, pp. 2635-2644, Dec, 2010.
- [161] Y. Nakamura, S. Miyakawa, Y. Nomura *et al.*, “Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G,” *Rna-a Publication of the Rna Society*, vol. 14, no. 6, pp. 1154-1163, Jun, 2008.
- [162] M. Reck, “Optimierung der Sekretion von rekombinanten Proteinen aus Escherichia coli durch Analyse der Genexpression,” Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2009.

E Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Miriam Lübbecke
Geburtsdatum: 27.07.1984
Geburtsort: Neustadt a. Rbge
Nationalität: Deutsch

Studium

seit Sept. 2008 Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Okt. 2003 - Jul. 2008 Studium der Chemie an der Leibniz Universität Hannover;
Abschluss Diplom-Chemikerin

Schulbildung

Aug. 1996 - Jul. 2003 Gymnasium Neustadt a. Rbge, Abschluss Abitur
Aug. 1994 - Jul. 1996 Orientierungsstufe, Neustadt a. Rbge
Aug. 1990 - Jul. 1994 Grundschule Hagen, Neustadt a. Rbge

F Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen

- [1] Aptamers as detection molecules on reverse phase protein microarrays for the analysis of cell lysates. 2011. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; akzeptiert in *Engineering in Life Sciences*
- [2] Characterization of optimal aptamer microarray binding chemistry and spacer design. 2011. Guohong Zhu, Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Chemical Engineering & Technology*, 34(12), 2022-2028
- [3] Transcriptome Analysis. 2011. Frank Stahl, Bernd Hitzmann, Kai Mutz, Daniel Landgrebe, Miriam Lübbecke, Cornelia Kasper, Johanna Walter, Thomas Scheper; akzeptiert in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*
- [4] Characterization of the human AGE1.HN cell line: a systems biology approach. 2011. Sebastian Scholz, Miriam Luebbecke, Alexander Rath, Eva Schraeder, Thomas Rose, Heino Büntemeyer, Thomas Scheper, Udo Reichl, Thomas Noll; *BMC Proceedings*, 5(8), 78-80
- [5] Anwendungen von Aptameren in der Mikroarray-Technologie. 2011. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; *BioSpektrum*, 2, 162-164
- [6] Microarray-basiertes Screening von Aptameren für analytische Methoden. 2010. Johanna-Gabriela Walter, Miriam Lübbecke, Guohong Zhu, E. S. Sinitsyna, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Chemie Ingenieur Technik*, 82(9), 1551
- [7] Strategien für die Detektion von Proteinen mit aptamer-basierten Microarrays. 2010. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Guohong Zhu, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Chemie Ingenieur Technik*, 82(9), 1546-1547

Kongressbeiträge

- [1] Aptamer-Microarrays for Detection of Proteins. 2011. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; 10th workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, 19-22. Juni, Weimar
- [2] Aptamer-modified Gold Nanoparticles for Biosensing. 2011. Johanna-Gabriela Walter, Rebecca Bongartz, Miriam Lübbecke, Frank Stahl, Svea Petersen, Stefan

- Barcikowski, Thomas Scheper; 10th workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, 19-22. Juni, Weimar
- [3] Characterization of the human AGE1.HN cell line-a systems biology approach. 2011. Sebastian Scholz, Miriam Lübbecke, Alexander Rath, Eva Schröder, Heino Büntemeyer, Thomas Scheper, Udo Reichl, Thomas Noll; ESACT-Cell based Technologies, 15.-18. Mai, Wien
- [4] Aptamer-Microarrays: Reverse and Sandwich Formate. 2011. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; Functional Genomics - Next Generation Applications and Technologies, 3.-4. Februar, Frankfurt
- [5] Microarray-based Screening of Aptamers. 2011. Johanna-Gabriela Walter, Miriam Lübbecke, Guohong Zhu, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; Functional Genomics - Next Generation Applications and Technologies, 3.-4. Februar, Frankfurt
- [6] Detection strategies for protein microarrays based on aptamers. 2010. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Guohong Zhu, Frank Stahl, Thomas Scheper; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 21.-23. September, Aachen
- [7] Microarray-based Screening of Aptamers for Analytical Applications. 2010. Johanna-Gabriela Walter, Miriam Lübbecke, Guohong Zhu, Frank Stahl, Thomas Scheper; 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 21.-23. September, Aachen
- [8] Reversed Phase Assay for Protein Detection on Microarrays via Aptamers. 2010. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; 12th Status Seminar Chip Technologies, Sequencing and Functional Genomics, 4.-5. Februar, Frankfurt
- [9] Detection Strategies for Protein Microarrays based on Aptamers. 2009. Miriam Lübbecke, Kai-Oliver Mutz, Frank Stahl, Thomas Scheper; 9. Dresdner Sensor Symposium, 7.-9. Dezember, Dresden
- [10] Various Detection Strategies on Protein Microarrays via Aptamers. 2009. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; BioSys, 15.-17. Oktober, Hamburg
- [11] Optimization of Aptamer Immobilization for Protein Microarray Application. 2009. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; 11th Status Seminar Chip Technologies, 5.-6. März, Frankfurt
- [12] Optimization of Aptamer Immobilization for Protein Microarray Application. 2008. Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; European BioPerspectives, 7.-9. Oktober, Hannover