

# **Neue Aptamer-basierte Strategien zur Aufreinigung und zur Detektion rekombinanter Proteine**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von

M. Sc. Maren Lönne

geboren am 15.03.1987 in Beckum

2015

M. Sc. Maren Lönne

*Neue Aptamer-basierte Strategien zur Aufreinigung und zur Detektion rekombinanter Proteine*

Dissertation, 2015

**Referent:** Prof. Dr. Thomas Scheper

**Korreferenten:** Prof. Dr. Ursula Rinas  
Prof. Dr. Roland Ulber

**Tag der Promotion:** 18.08.2015

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema

“NEUE APTAMER-BASIERTE STRATEGIEN ZUR AUFREINIGUNG  
UND ZUR DETEKTION REKOMBINANTER PROTEINE”

selbstständig und lediglich unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder einer anderen Prüfungskommission vorgelegt noch veröffentlicht.

Hannover, im April 2015

*»Wir stehen vor einer Reihe großartiger Herausforderungen, die clever als unlösbare Probleme getarnt sind.«*

Charles H. Spurgeon

## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis am Institut für Technische Chemie zu promovieren und für die Freiheiten in der Ausgestaltung des Themas.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Rinas und Herrn Prof. Dr. Roland Ulber für die Übernahme der Korreferate sowie bei Prof. Dr. Anaclét Ngezahayo für die Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Ich bedanke mich bei der Firma NanoTemper Technologies für den Einblick in die Bestimmung von Bindekonstanten und die Möglichkeit, die Thermophoresemessungen durchzuführen.

Herrn Dr. Frank Stahl möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die finanzielle Verwaltung der Projektmittel - insbesondere die vielen unterschriebenen Bestellscheine - sowie für das abschließende Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Johanna Walter, dem Kopf der Aptamergruppe. Vielen Dank für die vielen Diskussionen erfreulicher und auch unerfreulicher Versuchsergebnisse, für die Hilfe bei der Suche nach Banden auf SDS-Gelen und nach Erklärungen für unspezifische Bindungen. Danke auch für die Erinnerungen an die gemeinsamen Dienstreisen nach Boston und Würzburg.

Frau Antonina Lavrentieva danke ich für die kurzzeitige Wiedereingliederung in die Zellkulturgruppe und die Unterstützung bei der Durchführung der Bioaktivitätstests.

Einige Experimente dieser Doktorarbeit wurden von Studenten im Rahmen von Praktika, Bachelor- und Masterarbeiten mitentwickelt oder durchgeführt. Euch allen ein herzliches Dankeschön für eure Unterstützung. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Svenja Bolten, nicht nur für die unzähligen Messungen am NanoDrop.

Den Kollegen der Aptamergruppe Alexandra Heilkenbrinker, Michael Meyer, Emilia Schax, Mehriban Akin, Katharina Urban, Martin Witt, Tracy Kurth und André Jochums danke ich sowohl für ihre fachliche als auch moralische Unterstützung und die stets gute Laune in den RNA- und PCR-Laboren. Dem Büro 006, namentlich Alex, Fred und Martin danke ich für die unterhaltsame aber nicht minder arbeitsame Büroatmosphäre während der vergangenen drei Jahre und für die stetige Versorgung mit Fruchtgummis. Gemeinsam mit allen anderen Kollegen und Freunden im Institut habt ihr die Zeit am TCI zu einer besonderen Zeit gemacht.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinen Brüdern und dem Rest der Familie für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion danken. Ich bin unendlich dankbar, dass ich immer auf euch zählen kann.

## Abstract

Personalized therapies in modern medicine offer new prospects in medical treatments. However, they represent a considerable cost factor in the healthcare system. To counteract increasing financial pressure, new diagnostic detection platforms as well as efficient methods for recombinant protein purification for pharmaceutical or biomedical applications are a requirement. Diagnostic test systems as well as protein affinity purification are based on affinity ligands, such as antibodies enabling specific recognition and binding of the target molecule. A promising alternative to these classical affinity ligands are aptamers, a group of single-stranded oligonucleotides. Aptamers offer similar binding properties like antibodies. However, they are cheaper in production, as they are chemically synthesized and they offer a higher chemical stability.

This work describes two fields of aptamer application in pharmaceutical biotechnology: the utilization of aptamers in protein detection and in protein purification. Both applications were analyzed based on the vascular endothelial growth factor (VEGF) as model protein. To provide sufficient quantities of protein material, VEGF was recombinantly produced in *E. coli* and purified by chromatography.

In the first sub-project of this work, VEGF-binding aptamers were used for the development of aptamer microarrays for VEGF detection. Microarrays are miniaturized detection systems containing only slight amounts of affinity ligands. In addition, they allow simultaneous analysis of multiple samples or multiple analytes in one sample, respectively. In this work, the development of aptamer microarrays in reverse phase and sandwich formats is described and afterwards the specificity of aptamer-VEGF-binding is analyzed. Based on the reverse phase format, the binding affinities are characterized and the detection of VEGF in complex protein samples is accomplished.

In the second sub-project of this work, aptamers are immobilized on magnetic bead particles providing an affinity matrix for VEGF purification. Therefore, different surface materials are tested and a method for aptamer immobilization is established. Afterwards, VEGF binding is optimized by introduction of spacers between aptamers and magnetic beads. The influence of aptamer density on VEGF binding capacity is analyzed and further, a method for VEGF elution is developed. Finally, the application of the established purification process to VEGF purification from complex protein mixtures is proven.

Keywords: aptamer microarray, protein detection, protein purification, VEGF

## Zusammenfassung

Die moderne Medizin bietet mit personalisierten Therapien neue Chancen zur Behandlung komplexer Krankheitsbilder, stellt jedoch gleichzeitig einen erheblichen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem dar. Um diesem Kostendruck entgegenzuwirken, besteht Bedarf an neuen kostengünstigen diagnostischen Detektionssystemen und auch an effizienten Methoden zur Aufreinigung rekombinanter pharmazeutischer Proteine. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Affinitätsaufreinigung von Proteinen werden Affinitätsliganden, wie z. B. Antikörper zur spezifischen Erkennung und Bindung des Zielmoleküls eingesetzt. Eine vielversprechende Alternative zu diesen klassischen Affinitätsliganden stellt die Molekülklasse der Aptamere dar, die im Gegensatz zu Antikörpern kostengünstig synthetisiert werden können und eine höhere chemische Stabilität aufweisen.

Diese Arbeit beschreibt zwei mögliche Einsatzgebiete von Aptameren in der pharmazeutischen Biotechnologie: Zum einen wird die Anwendung von Aptameren in der Proteindetektion zum anderen in der Proteinaufreinigung beschrieben, wobei der humane Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) als Modellprotein dient. Um genügend Proteinmaterial bereitzustellen, wird VEGF rekombinant in *E. coli* überexprimiert und chromatographisch aufgereinigt.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit werden VEGF-bindende Aptamere zur Entwicklung eines Aptamer-Microarrays zur Detektion von VEGF eingesetzt. Microarrays stellen miniaturisierte Detektionssysteme dar, die nur geringe Mengen des Affinitätsliganden erfordern und darüber hinaus die simultane Analyse einer Vielzahl von Proben bzw. verschiedener Analyten in einer Probe erlauben. Es wird die Entwicklung von Aptamer-Microarrays im *Reverse Phase* und im *Sandwich* Format beschrieben und im Anschluss für beide Formate die Spezifität der Aptamer-VEGF-Bindung analysiert. Anhand des *Reverse Phase* Assays wird weiterhin die Affinität der Aptamere zum VEGF charakterisiert und die Detektion des VEGF in komplexen Proteingemischen realisiert.

Im zweiten Teilprojekt der Arbeit werden Aptamere auf Magnetpartikel immobilisiert, um eine Affinitätsmatrix zur VEGF-Aufreinigung bereitzustellen. Hierzu werden zunächst verschiedene Oberflächen getestet, eine Methode zur Aptamerimmobilisierung etabliert und anschließend die VEGF-Bindung optimiert. Hierzu wird der Einfluss der Aptamerdichte und von Spacern zwischen Magnetpartikel und Aptameren auf die VEGF-Bindekapazität analysiert. Anschließend wird eine Methode zur VEGF-Elution entwickelt und die Anwendbarkeit der entwickelten Verfahren anhand der Aufreinigung von VEGF aus komplexen Proteinproben nachgewiesen.

Schlagwörter: Aptamer-Microarray, Proteindetektion, Proteinaufreinigung, VEGF

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung . . . . .	2
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Aptamere als Affinitätsliganden in der Biotechnologie . . . . .	3
2.1.1 Aptamerfaltung und -konformation . . . . .	5
2.1.2 Aptamer-Target-Bindung . . . . .	6
2.1.3 Aptamere Selektion . . . . .	7
2.2 Aptamer-Microarrays zur Proteindetektion . . . . .	11
2.3 Aptamere in der Affinitätsaufreinigung von Proteinen . . . . .	16
2.4 Aptamere gegen den Vaskulären Endothelilalen Wachstumsfaktor (VEGF) . . . . .	19
2.4.1 Die Vaskulären Endotheliale Wachstumsfaktoren . . . . .	19
2.4.2 VEGF-bindende Aptamere . . . . .	22
<b>3 Bereitstellung des Targetproteins VEGF</b>	<b>29</b>
3.1 Klonierung . . . . .	29
3.1.1 Gensynthese . . . . .	30
3.1.2 Konstruktion des Expressionsvektors . . . . .	31
3.1.3 Transformation . . . . .	32
3.2 Kultivierung und Proteinexpression . . . . .	33
3.3 Proteinaufreinigung . . . . .	36
3.4 Proteincharakterisierung . . . . .	41
3.4.1 Biochemische Eigenschaften . . . . .	41
3.4.2 Biologische Aktivität . . . . .	42
<b>4 Bereitstellung VEGF-bindender Aptamere</b>	<b>44</b>
4.1 Auswahl der Aptamere . . . . .	44

4.2	Nachweis der Aptamer-Protein-Bindung in Lösung . . . . .	45
4.3	Bestimmung von Affinitäten in Lösung . . . . .	46
4.3.1	Einfluss von Aptamermodifikationen auf die Affinität . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Entwicklung von Aptamer-Microarrays zur Detektion von VEGF</b>	<b>51</b>
5.1	Etablierung eines <i>Reverse Phase</i> Aptamer-Microarrays . . . . .	52
5.1.1	Proteinimmobilisierung . . . . .	53
5.1.2	Entwicklung des Detektionsassays . . . . .	56
5.1.3	Charakterisierung der Aptamer-Protein-Bindung . . . . .	61
5.1.4	Detektion von VEGF . . . . .	66
5.2	Entwicklung eines <i>Sandwich</i> Aptamer-Microarrays . . . . .	71
5.2.1	Auswahl geeigneter Microarray-Oberflächen und Aptamere . . . . .	72
5.2.2	Immobilisierung des Fängeraptamers . . . . .	73
5.2.3	Blockierung der Glasoberfläche . . . . .	73
5.2.4	Entwicklung des Detektions-Assays . . . . .	74
<b>6</b>	<b>Entwicklung einer Aptamer-basierten Aufreinigungsstrategie</b>	<b>82</b>
6.1	Bereitstellung der Affinitätsmatrix . . . . .	83
6.1.1	Auswahl geeigneter Magnetpartikeloberflächen . . . . .	83
6.1.2	Funktionalisierung der Magnetpartikel . . . . .	88
6.2	Funktionstestung der Aptamer-Affinitätsmatrix . . . . .	91
6.2.1	Charakterisierung der Proteinbindung . . . . .	92
6.2.2	VEGF-Elution . . . . .	97
6.2.3	Regeneration der Affinitätsmatrix . . . . .	99
6.3	Verwendung der Aptamer-Affinitätsmatrix zur VEGF-Aufreinigung . . . . .	100
6.3.1	Aufreinigung aus komplexen Proteinproben . . . . .	100
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>103</b>
<b>A</b>	<b>Materialien</b>	<b>107</b>
A.1	Verbrauchsmaterialien . . . . .	107
A.2	Geräte . . . . .	108
A.3	Microarray-Substrate und Magnetpartikel . . . . .	109
A.4	Chemikalien . . . . .	109
A.5	Lösungen, Medien und Puffer . . . . .	111
A.6	Nukleinsäuresequenzen . . . . .	113
A.7	Biomoleküle, Vektoren und Zellen . . . . .	114
A.8	Reaktionskits . . . . .	115

<b>B Methoden</b>	<b>116</b>
B.1 Molekularbiologische Methoden . . . . .	116
B.1.1 Allgemeine Methoden . . . . .	116
B.1.2 Klonierung . . . . .	118
B.2 Proteinexpression . . . . .	119
B.3 Proteinaufreinigung . . . . .	120
B.4 Proteinanalytik . . . . .	122
B.4.1 Allgemeine Methoden . . . . .	122
B.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	123
B.5 Zellkulturtechniken . . . . .	124
B.6 Bestimmung von Affinitäten . . . . .	125
B.6.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay . . . . .	125
B.6.2 Mikrothermophorese . . . . .	125
B.7 Aptamer-Microarrays . . . . .	126
B.7.1 <i>Reverse Phase</i> Microarray . . . . .	126
B.7.2 <i>Sandwich</i> Microarray . . . . .	128
B.8 Aptamer-basierte Aufreinigung . . . . .	130
B.8.1 Auswahl geeigneter Oberflächen . . . . .	130
B.8.2 Aptamerimmobilisierung . . . . .	131
B.8.3 Aptamer-Affinitätsaufreinigung . . . . .	132
<b>C Ergänzende Versuchsergebnisse</b>	<b>134</b>
C.1 Sequenz des VEGF-Inserts . . . . .	134
C.2 Proteinsequenz des VEGF-Fusionsproteins . . . . .	134
C.3 Bestimmung der Spacer-Längen . . . . .	134
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>154</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>Mitarbeit an Experimenten</b>	<b>158</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>159</b>
Publikationen und Kongressbeiträge . . . . .	160

# 1 Einleitung

Ein neuer Trend in der Behandlung komplexer Krankheitsbilder ist die personalisierte Medizin, die den Patienten individuelle Therapieansätze verspricht. Je nach genetischer Veranlagung, Geschlecht und physiologischer Konstitution reagieren Personen sehr unterschiedlich auf bestimmte Behandlungsmethoden oder Wirkstoffe. Sowohl die Wirksamkeit als auch die Verträglichkeit von Medikamenten kann von Patient zu Patient stark variieren. Gewisse persönliche Veranlagungen können schon heute anhand biologischer Marker vor Beginn der Therapie identifiziert werden. In Deutschland sind aktuell 33 Wirkstoffe zugelassen, für die ein diagnostischer Vortest vorgeschrieben ist, für neun weitere wird er empfohlen [1]. Die Vortests untersuchen jeweils die Anwesenheit oder den Zustand eines relevanten Gens, Proteins oder Zelltyps in Blut- oder Gewebeproben und liefern so wertvolle Informationen über die Erfolgsaussichten der geplanten Therapie. Bislang werden diese diagnostischen Vortests überwiegend in der Krebstherapie eingesetzt; es ist jedoch zu erwarten, dass sie sich zukünftig in der Behandlung weiterer Krankheitsbilder etablieren.

Da sich mit diesen zusätzlichen diagnostischen Möglichkeiten auch die Therapiekosten für jeden einzelnen Patienten erhöhen, bedeutet die zu erwartende steigende Anzahl diagnostischer Tests für das Gesundheitssystem vor allem eine finanzielle Mehrbelastung. Um dem Kostendruck entgegen wirken zu können, besteht Bedarf an effizienten diagnostischen Testsystemen, die in großem Maßstab als kostengünstiges diagnostisches Produkt hergestellt werden können. Miniaturisierte Detektionssysteme im Microarray-Format erlauben die simultane Analyse einer Vielzahl von Proben bzw. verschiedener Analyten in einer Probe und stellen somit eine Möglichkeit dar, ein solches Testsystem zu realisieren.

Ein diagnostischer Test zur Detektion eines Proteinbiomarkers basiert häufig auf Antikörpern, die das Zielprotein spezifisch binden. Die Isolation eines solchen Antikörpers ist aufwändig und die Antikörperproduktion im großen Maßstab teuer. Eine mögliche Alternative zum Antikörper als Detektionsmolekül könnten Aptamere sein. Es handelt sich hierbei um einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle, die mit vergleichbarer Affinität und Spezifität wie ein Antikörper an ihr Targetprotein binden. Im Gegensatz zu Antikörpern werden Aptamere chemisch synthetisiert und sind somit auch in großen Mengen günstig produzierbar. Weiterhin können Aptamere gegen Oberflächenproteine oder ganze Oberflächenstrukturen auf der Zelloberfläche gerichtet sein, wodurch sie sich ebenfalls zur Detektion von Zellbiomarkern eignen.

Aptamere wurden bereits erfolgreich zur Analytik, in bildgebenden Verfahren und als Therapeutikum eingesetzt. Darüber hinaus können sie in der Affinitätsaufreinigung pharmazeutischer Proteine eine Alternative zu üblichen Affinitätsliganden wie Antikörpern, Protein A oder Heparin sein. Diese werden entweder aus tierischem Material gewonnen oder rekombinant in Bakterien produziert wodurch die Gefahr besteht, Kontaminationen durch Endotoxine, Viren oder andere Pathogene in den Prozess einzubringen. Aptamere dagegen bergen kein Kontaminationsrisiko, da sie *in vitro* selektiert werden und unter GMP-Bedingungen synthetisiert werden können.

## 1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, das Potential der Aptamere als Affinitätsliganden in der Proteindetektion und -aufreinigung zu untersuchen und so eine Alternative zu Antikörpern aufzuzeigen. Hierzu werden der humane Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und vier verschiedene VEGF-bindende Aptamere als Modellsystem verwendet.

Um ausreichend Proteinmaterial zur Verfügung zu stellen, soll die rekombinante Produktion des VEGF in *E. coli* realisiert und eine Strategie zur Aufreinigung etabliert werden. Eine besondere Herausforderung stellt dabei der Erhalt der nativen Proteinkonformation dar, die für die spätere Verwendung des VEGF als Aptamertarget unverzichtbar ist. Sie soll mit Hilfe eines biologischen Aktivitätstests nachgewiesen werden.

Im Anschluss soll auf Basis der Aptamer-Microarray-Technologie ein robustes und sensitives Detektionssystem zum Nachweis von VEGF entwickelt werden. Hierzu sollen Vor- und Nachteile zweier verschiedener Microarray-Formate, des *Reverse Phase* und des *Sandwich* Microarrays, untersucht werden. Der Fokus soll dabei auf die Eignung einzelner Aptamere als Detektionsmoleküle, den Einfluss variierender Detektionsbedingungen und die Spezifität des Detektions-Assays gegenüber Nicht-Targetproteinen gerichtet werden.

Weiterhin soll die Eignung von Aptameren als Affinitätsliganden in der Affinitätsaufreinigung von VEGF nachgewiesen werden. Hierzu soll durch Immobilisierung der Aptamere auf Magnetpartikel eine Affinitätsmatrix hergestellt werden. Die Immobilisierung der Aptamere ist ein kritischer Schritt, da sie die Faltung der Aptamere in ihre typische dreidimensionale Struktur behindern und somit die Bindung des Targets VEGF beeinträchtigen kann. Daher soll der Einfluss verschiedener Magnetpartikeloberflächen, Immobilisierungsstrategien und spezieller Spacer-Moleküle auf den Aufreinigungserfolg untersucht werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Aptamere als Affinitätsliganden in der Biotechnologie

Aptamere sind einzelsträngige DNA oder RNA-Oligonukleotide, die Antikörper-ähnliche Molekül-Bindeeigenschaften aufweisen [2]. So wurden die ersten Protein-bindenden Nucleinsäuren auch als »*nucleic acid antibodies*« bezeichnet bevor sich der Begriff Aptamer (lat. *aptus* passen) durchsetzte [3]. Aptamere falten sich in Folge intramolekularer Wechselwirkungen in komplexe dreidimensionale Strukturen, mit denen sie in der Lage sind, ihr zugehöriges Targetmolekül zu erkennen und zu binden [4]. Die Affinität eines Aptamers beschränkt sich dabei nicht nur auf Proteine. Stattdessen können sie ebenfalls gegen kleine organische Moleküle wie Toxine [5, 6], Cofaktoren [7], Antibiotika [8, 9] oder einzelne Aminosäuren [10], gegen Polymere wie z. B. Polysaccharide [11] und weiterhin gegen komplexe Zelloberflächenstrukturen [12, 13] gerichtet sein. Sie sind somit nicht nur eine Alternative zu Antikörpern in der bioanalytischen, diagnostischen oder therapeutischen Anwendung, sondern erweitern deren Anwendungsgebiete sogar. Eine Übersicht möglicher Aptamerapplikationen ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

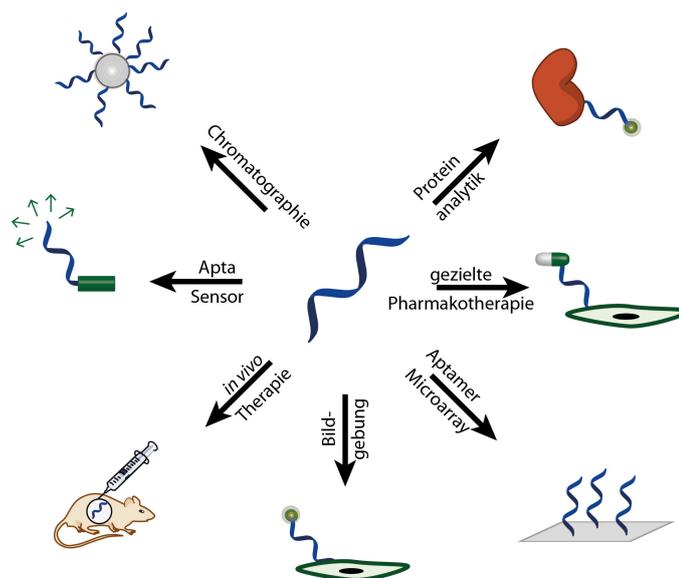


Abbildung 2.1: Verwendung von Aptameren in diversen bioanalytischen und biomedizinischen Gebieten.  
Modifiziert nach [14].

Aptasensoren dienen der qualitativen und quantitativen Analytik einzelner Molekültypen in komplexen Proben. Ein Aptasensor ist ein Biosensor, dessen biologisches Erkennungsmolekül ein Aptamer darstellt, während das Transducer-Element elektrochemischer, optischer oder thermaler Natur sein kann. Durch Bindung des Targetmoleküls an das Aptamer wird ein messbares Signal, wie z. B. ein verändertes elektrochemisches Potential oder ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Menge des gebundenen Moleküls ist. Aptasensoren wurden bereits für kleine Targetmoleküle wie aminoglycosidische Antibiotika [14] oder Ethanolamin [15] und für Proteine wie das Interferon  $\gamma$  oder das Thrombin entwickelt [14].

Ebenfalls zur spezifischen Detektion von Analyten werden Aptamer-Microarrays eingesetzt. Hier findet die Aptamer-Target-Bindung an einer Glas- oder Polymeroberfläche statt, auf der einer der beiden Bindungspartner immobilisiert ist. Prinzipiell kann ein Aptamer-Microarray in drei verschiedenen Formaten aufgebaut sein. Die größte Relevanz in Bezug auf die praktische Anwendung hat von diesen das *Sandwich* Microarray-Format. Hier wird das Targetprotein von einem auf dem Glasobjektträger immobilisierten Fängeraptamer gebunden und anschließend mit einem weiteren meist fluoreszenzmarkierten Aptamer detektiert. Auf einem Microarray können theoretisch hunderte verschiedener Fängeraptamere immobilisiert werden, was die simultane Untersuchung von hunderten verschiedener Analyten in einem Experiment ermöglicht. Aptamer-Microarrays eignen sich somit zur komplexen Analytik bis hin zu Erstellung von Proteomprofilen [16].

In der chromatographischen Anwendung dienen Aptamere als Affinitätsliganden zur analytischen oder präparativen Trennung komplexer Proben. Dies wurde bereits zur Trennung organischer Moleküle bis hin zur Trennung verschiedener Enantiomere verwendet. Weiterhin ist die chromatographische Aufreinigung pharmazeutischer Proteine oder die Abreicherung toxischer Substanzen relevant [14, 17].

Zur Proteinanalytik können Aptamere eingesetzt werden, die konformative Epitope oder Phosphatgruppen des Proteins erkennen und somit Informationen über den Faltung- oder Phosphorylierungszustand des Proteins liefern. Weiterhin können Aptamere einen Beitrag zur Aufklärung von Signaltransduktions- oder Stoffwechselwegen leisten, indem sie zur Inhibierung Signalweg-spezifischer Enzyme eingesetzt werden [18].

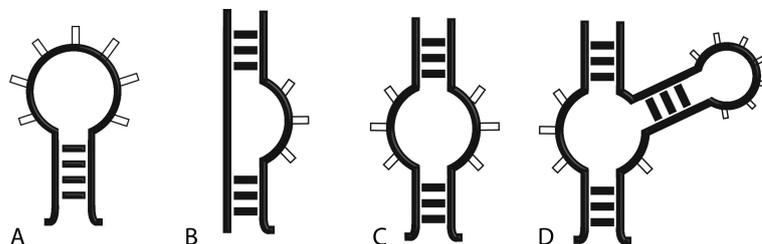
Im Rahmen bildgebender Verfahren können Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* selektiv anhand ihrer Oberflächenproteine mit Aptameren angefärbt werden. Bislang wurden solche Verfahren überwiegend zur Detektion und Lokalisation verschiedener Krebszellen verwendet. *In vitro* erfolgte die Detektion fluoreszenzmarkierter Aptamere mit durchflusscytometrischen Methoden oder per Konfokalmikroskopie [14]. *In vivo* wurden bereits mit Eisenoxid-Nanopartikeln konjugierte Aptamere genutzt, um Krebszellen per Magnetresonanztomographie zu lokalisieren. Weiterhin wurden diese Magnetpartikel-konjugierten Aptamere zum gezielten Transport von Wirkstoffen zu ihrem Wirkort

eingesetzt [19]. Diese gezielte Pharmakotherapie wurde bereits für mehrere Medikamente untersucht und führte zur verbesserten Pharmakokinetik, Biodistribution, Verträglichkeit und Wirksamkeit [14].

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Aptamere als *in vivo* Therapeutika zu verwenden. Das erste und bislang einzige Aptamer-basierte Medikament wurde 2004 von der Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der altersbedingten Makulardegeneration zugelassen und wirkt als Antagonist des Wachstumsfaktors VEGF. 2013 befanden sich darüber hinaus neun weitere Aptamerkandidaten in den Phasen I-III klinischer Studien [20].

### 2.1.1 Aptamerfaltung und -konformation

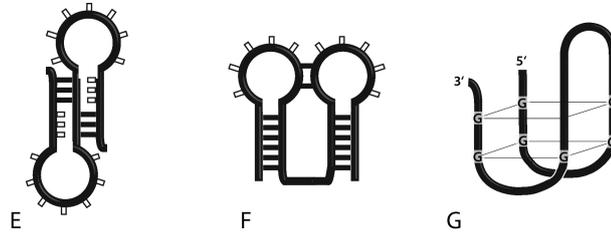
Einzelsträngige Oligonukleotide falten sich ähnlich wie Proteine in dreidimensionale Strukturen, da diese gegenüber einer gestreckten Konformation energetisch begünstigt sind. Das Rückgrat eines Aptamers ist dabei aufgrund von fünf frei drehbaren Bindungen pro Nukleotid sehr flexibel und erlaubt diverse Konformationen. Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen müssen während der Faltung elektrostatische Abstoßungskräfte überwunden werden, weshalb die Faltung in der Regel auf die Anwesenheit von verbrückender Kationen angewiesen ist [21]. Treibende Kraft der Aptamerfaltung sind intramolekulare Wechselwirkungen insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen, die zur Ausbildung sequenzspezifischer Sekundärstrukturelemente führen.



**Abbildung 2.2:** Einfache Sekundärstrukturen einzelsträngiger Oligonukleotide. Dargestellt sind A: Haarnadelstruktur, B: Wölbung, C: Interne Schleife, D: Mehrfachverzweigung.

Diese bestehen in der Regel aus *Stem-Loop*-Strukturen in Form von Haarnadelstrukturen, Wölbungen, internen Schleifen und Mehrfachverzweigungen [22], die in Abbildung 2.2 dargestellt sind. Dabei werden die gepaarten Bereiche von Watson-Crick-Basenpaaren gebildet, während die Loops durch Nicht-Watson-Crick-Interaktionen stabilisiert werden [21]. Je nach Länge der Nukleotidsequenz können Aptamere ein oder mehrere solcher Struktur motive ausbilden, die weiterhin miteinander oder mit ungepaarten Basen interagieren können, so dass komplexe Sekundärstrukturen wie Pseudoknoten oder Kissing-Hairpins entstehen (dargestellt in Abbildung 2.3) [23, 24]. Ein weiteres häufiges Strukturmotiv, das in Guanin-reichen Sequenzen vorkommt, ist die G-Quadruplex. Hier bilden je vier Guaninbasen durch Hoogsteen-Basenpaarung ein planares G-Quartett, wobei zwei oder mehrere dieser Quartetts sich zur Quadruplex stapeln können. Im Zentrum lagern sich monovalente oder

seltener auch divalente Kationen ein, die durch elektrostatische Wechselwirkungen die Quadruplex-Struktur stabilisieren. Dabei beeinflussen sie aufgrund unterschiedlicher sterischer Ansprüche die tatsächliche Geometrie der Quadruplex [25].



**Abbildung 2.3:** Komplexe Sekundärstrukturen einzelsträngiger Oligonukleotide. Dargestellt sind E: Pseudoknoten, F: Kissing-Hairpins, G: G-Quadruplex.

Jedes Aptamer ist in der Lage, mehrere der beschriebenen Sekundärstrukturen auszubilden, die in der Regel miteinander im Gleichgewicht stehen. Die ausgebildete Aptamerstruktur ist dabei stark von den Umgebungsbedingungen wie Metallionen [26] und der Temperatur [27] abhängig. Es ist möglich, durch chemische Modifikationen die Flexibilität des Aptamers so zu verändern, dass die gewünschte Konformation stabilisiert wird. Dies wurde beispielsweise für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Aptamer V7t1 erfolgreich durchgeführt [28].

### 2.1.2 Aptamer-Target-Bindung

Die Strukturanalyse diverser Aptamer-Ligand-Komplexe im Vergleich zum freien Aptamer haben Unterschiede in der Aptamerkonformation aufgezeigt, wobei diese unterschiedlich stark ausgeprägt sind [29]. Daher wird davon ausgegangen, dass die meisten Aptamere ihr Target nach einem *Induced-Fit*-Mechanismus binden, wobei die Bindetasche in Abwesenheit des Targets unstrukturiert oder teilweise unstrukturiert vorliegt und erst mit Bindung des Targets ihre endgültige Konformation annimmt [30]. Somit sind die oben beschriebenen Aptamerkonformationen lediglich als Präorganisation des Aptamers zu verstehen, die dennoch eine wesentliche Rolle in der Erkennung des Targets spielen.

Die Wechselwirkung eines Aptamers mit seinem Target beruht in erster Linie auf elektrostatischen Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen [31]. Während die vorherrschenden Kräfte bei kleinen Targetmolekülen vergleichsweise einfach zu identifizieren sind, können in der Protein-Aptamer-Wechselwirkung diverse Binderegionen und Wechselwirkungen an der Targetbindung beteiligt sein. Im Folgenden soll der Fokus auf Proteine als Targetmoleküle gerichtet werden.

Elektrostatische Wechselwirkungen treten in der Aptamer-Protein-Bindung meist zwischen den Phosphatgruppen des Aptamers und Lysin- oder Arginin-reichen Domänen des Proteins auf und sind somit unabhängig von der Aptamersequenz. Häufig sind die entstehenden Salzbrücken Ursache un-

spezifischer Wechselwirkungen [31]. Es wurde festgestellt, dass einige alkalische Proteine, wie das Lysozym, nicht spezifisch von ihrem Aptamer gebunden werden, obwohl dieses eine hohe Affinität aufweist [32]. Dies ist vermutlich auf die in Summe starken elektrostatischen Anziehungskräfte, bekannt als Polyelektrolyteffekt, zurückzuführen [33]. Dennoch können die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Aptamerrückgrat die spezifische Targetbindung unterstützen indem sie die richtige Positionierung des Targets in der Bindetasche vermitteln und so die Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen erst ermöglichen [34].

Hydrophobe Wechselwirkungen spielen bei der Entstehung von Basenstapeln eine wichtige Rolle. Die planaren heteroaromatischen Ringe der Nukleobasen lagern sich parallel zueinander an und ermöglichen so die Wechselwirkungen zwischen den  $\pi$ -Systemen. Zwischen diese Basenstapel können sich planare Aminosäuren wie Histidin, Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin einlagern [31]. Auch diese Art von Wechselwirkung ist isoliert betrachtet unabhängig von der Aptamersequenz. In Kombination mit Wasserstoffbrückenbindungen kann sie jedoch zur sequenzspezifischen Interaktion beitragen, wie für die Polythymin-Erkennung eines bakteriellen Kälteschockproteins nachgewiesen wurde [34].

Spezifische Wechselwirkungen werden über Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. Sie werden vor allem von polaren Aminosäuren wie Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure sowie Arginin mit den Nukleobasen ausgebildet. Dabei können Glutaminsäure und Asparaginsäure das Cytosin imitieren und mit Guanin paaren. Asparagin und Glutamin können, je nach Orientierung, mit allen Basen wechselwirken [31].

Alles in allem ist der Mechanismus der Aptamer-Protein-Bindung ebenso wie ihr Einfluss auf die Bindespezifität aufgrund der molekularen Flexibilität beider Bindungspartner schwer vorherzusagen. Im Rahmen der *Induced Fit* Bindung können beide Bindungspartner ihre Konformation verändern, so dass neue Bindetaschen entstehen. Um eine klare Aussage treffen zu können, muss die Bindung für jedes Protein-Aptamer-Paar anhand von Strukturanalysen einzeln untersucht werden.

### 2.1.3 Aptamerselektion

Aptamersequenzen, die ein gewünschtes Targetmolekül binden, werden mit Hilfe eines *in vitro* Selektionsverfahrens identifiziert, das als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) bezeichnet wird. Das Verfahren wurde 1990 unabhängig voneinander von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt, wobei die eine Arbeitsgruppe ein RNA-Aptamer gegen organische Farbstoffe und die andere ein RNA-Aptamer gegen die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 selektierte [36, 37]. Die ersten DNA-Aptamere wurden zwei Jahre später mit Hilfe eines leicht modifizierten SELEX-Prozesses identifiziert [38, 39]. Dieses Verfahren zur Selektion von DNA-Aptameren ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

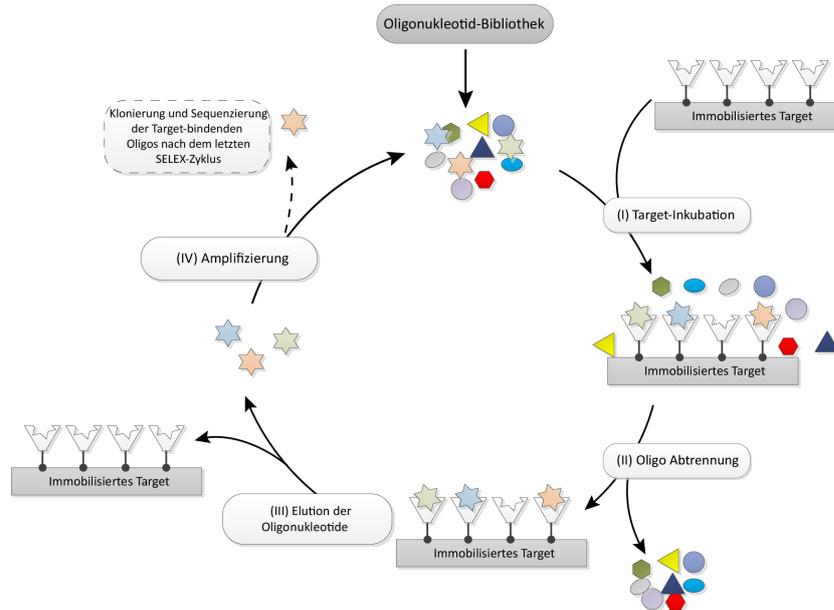


Abbildung 2.4: SELEX-Zyklus zur Selektion von DNA-Aptameren . Modifiziert nach [35].

Eine Oligonukleotidbibliothek mit  $10^{13}$ – $10^{16}$  verschiedenen Nukleotiden bestehend aus einer zufälligen Basensequenz, die von zwei festgelegten Primer-Sequenzen flankiert wird, dient als Startpunkt der Aptamerselektion. Sie wird mit dem Targetmolekül inkubiert, wobei abhängig von der Affinität zum Target einige Oligos an das Targetmolekül binden. Nicht-gebundene Oligonukleotide werden abgetrennt und in einem weiteren Schritt werden gebundene Oligos vom Target eluiert. Diese werden per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und die entstehenden DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt. Der resultierende Oligonukleotid-Pool dient als Startpunkt für den nächsten Selektionszyklus. Je nach Targetmolekül und Selektionsbedingungen wird der beschriebene Zyklus 5–15 mal durchlaufen. Nach dem letzten Zyklus werden die verbleibenden Sequenzen in Plasmide kloniert und anschließend sequenziert. In der Regel gehen aus einem Selektionsprozess etwa 50 Target-bindende Sequenzen hervor, deren Bindeeigenschaften im Anschluss genauer charakterisiert werden können [40].

Die einzelnen Schritte des SELEX-Prozesses können jeweils mit Hilfe unterschiedlicher Methoden realisiert werden. Dies ermöglicht es, Aptamere gegen nahezu jedes Targetmolekül zu selektieren und weiterhin die Selektionsbedingungen an die spätere praktische Anwendung der Aptamere anzupassen. Andererseits bedarf die Selektion eines Aptamers mit allen gewünschten Eigenschaften der gründlichen Planung des SELEX-Prozesses. Dabei spielt insbesondere die Wahl der Selektionsbedingungen eine wichtige Rolle.

### Wahl der Selektionsbedingungen

Ein wichtiger Schritt zur Selektion eines Aptamers ist die Inkubation des Oligonukleotid-Pools mit dem Targetmolekül. Ziel ist es, ein Aptamer zu selektieren, das sein Target mit hoher Affinität und Selektivität bindet. Unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Nicht-Targetmolekülen sollen dagegen vermieden werden. Wichtige Parameter während der Aptamerselektion sind pH-Wert, Ionenstärke und Cosolventien des Selektionspuffers, die Inkubationstemperatur und -zeit. Bei der Wahl der Pufferzusammensetzung und der Temperatur sollte die Struktur und Stabilität des Targetmoleküls berücksichtigt werden. Insbesondere Proteintargets können abhängig von den Pufferbedingungen unterschiedliche Konformationen annehmen, die mit der veränderten Struktur potentiell durch das Aptamer erkannter „Epitope“ einhergehen können. Durch Variation der Inkubationszeit kann die Stringenz der Aptamerselektion reguliert werden. Sie beträgt typischerweise zwischen 5 min und 1 h [41].

Weiterhin muss ein sinnvolles Verfahren zur Abtrennung nichtbindender Oligos gewählt werden. Hierzu sind bereits diverse Methoden entwickelt worden, die in drei Kategorien eingeteilt werden können: Methoden, die die Immobilisierung des Targetmoleküls erfordern, Methoden mit immobilisierten Oligonukleotiden und Methoden, die keine Immobilisierung erfordern. Jede Methode bringt Vor- und Nachteile mit sich, ist nicht für jeden Molekültyp anwendbar und muss daher für jeden SELEX-Prozess neu ausgewählt werden [42].

Die Separation ohne Immobilisierung kann entweder elektrophoretisch durch Kapillarelektrophorese oder per Membranfiltration erfolgen, bei der die Aptamer-Target-Komplexe von einer Nitrocellulosemembran zurückgehalten werden, während die freien Aptamere sie durchwandern können. Die Separationseffizienz beider Verfahren ist stark von den Moleküleigenschaften des Targets, wie Größe und Ladung abhängig und beide Separationsverfahren sind nicht für kleine Targetmoleküle anwendbar. Sie eignen sich zur Selektion von Aptameren, die später in Lösung eingesetzt werden sollen, wie zur Proteinanalyse, als Therapeutikum oder im Rahmen der Bildgebung.

Die Separation nach Immobilisierung des Targets ist einfach und effizient realisierbar. Je nach Immobilisierung auf Magnetpartikel, Nitrocellulosemembranen oder Agarosematrices, erfolgt die Separation magnetisch oder chromatographisch. Die Immobilisierung insbesondere großer Targets, wie z. B. Proteinen bringt dabei die Gefahr der Konformationsänderung oder Denaturierung des Targets mit sich. Weiterhin schränkt die feste Oberfläche den Interaktionsraum zwischen Aptamer und Target ein. Bedingt durch hohe Immobilisierungsdichten des Targets auf der Oberfläche kann Kooperativität der Aptamer-Target-Bindung auftreten und zum Überschätzen der Bindeaffinität führen [42]. Soll das Targetmolekül später von einem immobilisierten Aptamer detektiert werden, wie z. B. als Aptasensor, oder als Fängeraptamer in einem Sandwich Microarray-Experiment, ist die Immobilisierung der Oligonukleotide wie in der *Capture-SELEX* beschrieben empfehlenswert [43]. Die Proteinim-

mobilisierung eignet sich dagegen besonders zur Selektion von Detektionsaptameren für ein *Reverse Phase* oder *Sandwich* Microarray-Experiment.

Unabhängig von der gewählten Separationsmethode sollte berücksichtigt werden, dass in jedem Selektionsprozess unspezifische Wechselwirkungen mit Komponenten auftreten können, die unvermeidlich im Selektionsansatz vorhanden sind.

### **Anpassungen des SELEX-Prozesses**

Mit Hilfe des klassischen SELEX-Verfahrens wurden diverse spezifisch bindende Aptamere selektiert, allerdings auch solche, die nicht ausschließlich Affinität zu ihrem Targetprotein besitzen. Häufig binden diese Aptamere andere Komponenten des SELEX-Ansatzes, wie Pufferbestandteile und Oberflächenmaterialien zur Immobilisierung oder Separation. Um diese unspezifisch bindenden Aptamere abzutrennen, wurden zwei Verfahren entwickelt, die als *Negative-SELEX* und *Counter-SELEX* bezeichnet werden. Im Rahmen der *Negative-SELEX* wird der Oligonukleotid Pool zunächst mit der Target-freien Matrix inkubiert, so dass im Durchfluss bzw. Überstand nach Inkubation die Matrix-bindenden Oligonukleotide abgereichert wurden. Im Anschluss wird der Durchfluss mit dem immobilisierten Target inkubiert, um spezifisch bindende Aptamere zu isolieren. Mit Hilfe der *Counter-SELEX* können unspezifische Bindungen zu anderen Nicht-Targetmolekülen mit Target-ähnlicher Struktur oder zu erwartenden Bestandteilen komplexer Proben reduziert werden. Das Prinzip entspricht dem der *Negative-SELEX*, nur wird statt der unmodifizierten Matrix eine mit Nicht-Targetprotein modifizierte Matrix verwendet [44].

Ein interessantes Konzept zur Selektion von Aptameren für die Affinitätsaufreinigung ist die Aptamere-facilitated Protein Isolation from Cells (AptaPIC-Methode (*Aptamer-facilitated Protein Isolation from Cells*)), die bereits erfolgreich für die Proteine MutS und PDGF verwendet wurde [45, 46]. Hier wird ein rekombinant überexprimiertes Protein nicht in aufgereinigter Form sondern direkt im Zelllysate in den SELEX-Prozess eingebracht. Hierdurch verringert sich der Aufwand zur Vorbereitung der Selektion, da kein Aufreinigungsprozess für das Protein etabliert werden muss. Darüber hinaus wird das Aptamer unter Anwendungsbedingungen selektiert, was besonders für die Aufreinigung von Proteinen aus *Inclusion-Bodies*-Solubilisaten interessant ist, da die Proteine hier in nicht-nativer Konformation vorliegen. Um unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Bestandteilen des Zelllysates zu verhindern, wird auch hier eine *Counter-SELEX* mit Target-freiem Lysat in den Prozess integriert.

### **Elution des Targets**

Insbesondere während der Selektion von Aptameren für die Affinitätschromatographie oder für Aptasensoren kann die Targetelution als weiterer Schritt zur Auswahl des Aptamers genutzt werden. In

der Analytik ist die Targetelution zur Regeneration des Sensors erforderlich. In der Affinitätsaufreinigung muss sie darüber hinaus unter Bedingungen stattfinden, die das Target nicht zerstören. Die weitverbreitete Hitzeelution oder der Zusatz denaturierender Substanzen wie SDS, Triton X-100 oder Harnstoff ist zwar effizient, aber zur möglichst schonenden Proteinelution nicht geeignet. Stattdessen stellt bei Verwendung von Bindepuffern mit zweiwertigen Ionen die Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) eine elegante und nicht-denaturierende Elutionsstrategie dar. Weiterhin ist die kompetitive Verdrängung des Targets durch einen anderen hoch affinen Bindungspartner oder die Erhöhung der Ionenstärke im Puffer zur Targetelution möglich [40].

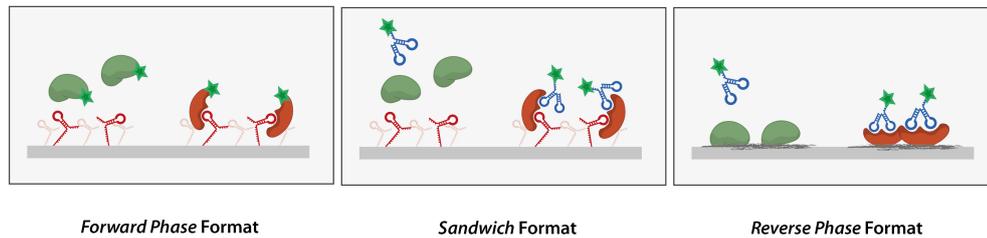
## 2.2 Aptamer-Microarrays zur Proteindetektion

Protein-Microarrays erlauben ähnlich wie ein klassischer *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) die spezifische Detektion und Quantifizierung einzelner Proteine in komplexen Proteingemischen. Im Gegensatz zum ELISA ist es dabei möglich, mehrere Proteine simultan zu detektieren, so dass für die analysierte Probe ein komplexes Proteinprofil erstellt werden kann. Es sind bereits kommerzielle Protein-Microarray Kits in verschiedenen Formaten verfügbar. Sie dienen beispielsweise zur Analyse von Immunreaktionen in Folge von Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder Krebs (PEPPERCHIP<sup>®</sup>, PEPPERPRINT GmbH) [47] oder zur Quantifizierung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Quantibody<sup>®</sup>, RayBiotech Inc.) in Zellkulturüberständen und Lysaten [48].

Zur Entwicklung eines solchen Protein-Microarrays muss für jedes Targetprotein mindestens ein Antikörper gefunden werden, der das Target mit hoher Affinität bindet. Die Produktion jedes einzelnen dieser Antikörper in ausreichenden Mengen bedeutet einen erheblichen finanziellen Aufwand [49]. Schätzungen zufolge sind nur etwa 20 % der bekannten Antikörper für einen quantitativen Microarray-Assay geeignet [50]. Aptamere hingegen sind mit Hilfe des SELEX-Prozesses und der voll automatisierbaren chemischen Synthese in großen Mengen selektierbar und synthetisierbar. Durch chemische Modifikationen können gezielt funktionelle Gruppen in die Aptamersequenz integriert werden, die die Konjugation des Aptamers mit einem Fluorophor oder der Microarray-Oberfläche an gewünschter, meist terminaler Position ermöglichen. So wird weitestgehend verhindert, dass die Targetbindende Region des Aptamers seine konformative Flexibilität verliert. Dies macht Aptamere zu vielversprechenden Alternativen zu Antikörpern als Detektionsmoleküle im Microarray-Assay.

### Microarray-Formate

In der Protein-Microarray-Technologie werden drei verschiedene Assay-Formate unterschieden, die sich in ihrem Experimentablauf unterscheiden: der *Reverse Phase*, der *Forward Phase* und der *Sandwich* Assay. Sie sind schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung eines Aptamer-basierten *Forward Phase*, *Sandwich* und *Reverse Phase* Assays.

Im *Forward Phase* Assay wird das Fängeraptamer auf dem Microarray-Slide immobilisiert. Die gesamte zu analysierende Probe wird fluoreszenzmarkiert und anschließend mit dem Slide inkubiert. Dabei wird das Targetprotein vom Aptamer gebunden, während andere Bestandteile der Probe durch Waschen wieder entfernt werden. Durch Auslesen des Fluoreszenzsignals wird somit nur der gebundene Analyt detektiert. Die notwendige Fluoreszenzmarkierung des Proteins stellt einen Nachteil dieses Assay Formats dar. Das Fluorophor wird meist über eine N-Hydroxysuccinimid- oder eine Isothiocyanat-Gruppe kovalent an primäre Aminogruppen in den Proteinseitenketten und am N-Terminus gebunden. Für Proteine, die wenig Lysin enthalten, ist die Markierungseffizienz daher gering, was zu einer verminderten Sensitivität des Assays führen kann. Weiterhin kann das Fluorophor „Epitope“ blockieren oder zerstören, über die das Aptamer das Protein normalerweise bindet [50].

Im *Reverse Phase* Assay wird die Analytlösung mit dem Targetprotein auf dem Microarray immobilisiert und anschließend durch Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Detektionsaptamer visualisiert. Die Immobilisierung des Proteins erfolgt in der Regel nicht-kovalent über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen [51, 52]. Die Gefahr, dass das Protein während der Immobilisierung denaturiert und so Epitope zerstört werden, wurde durch dreidimensionale Microarray-Oberflächen wie z.B. Beschichtungen mit Polymeren oder mit Nitrocellulose verringert. Diese bieten weiterhin den Vorteil, die Slide-Oberfläche zu vergrößern und so die Beladungskapazität zu erhöhen [53]. Problematisch ist die hohe Analytendichte innerhalb eines Proteinspots, die unspezifische Wechselwirkungen und somit falsch-positive Signale verursachen kann [50]. Weiterhin macht das Target nur einen geringen Anteil der immobilisierten Probe aus, so dass die Sensitivität dieses Microarray-Formats vergleichsweise gering ist.

Der *Sandwich* Assay kombiniert die beiden zuvor genannten Assay-Formate und ermöglicht so die Proteindetektion, ohne dass eine Markierung oder Immobilisierung des Proteins notwendig ist. Aufgrund der doppelten Aptamer-Target-Interaktion ist der Assay sehr spezifisch und weist weiterhin eine hohe Sensitivität auf. Die Entwicklung eines solchen Assays ist sehr komplex, da ein weiterer Inkubationsschritt notwendig ist und zwei Aptamere gefunden werden müssen, die das Target an unterschiedlichen Epitopen binden, damit sie nicht um eine Bindestelle des Targets konkurrieren [50].

In den vergangenen zehn Jahren wurden bereits einige Aptamer-basierte Microarray-Assays zur Detektion von Proteinen, kleinen Targets und zum Aptamer-Screening entwickelt. In Tabelle 2.1 sind bereits publizierte Aptamer-Microarrays zur Detektion von Proteinen aufgelistet. Die meisten von ihnen wurden im *Forward Phase* Format durchgeführt, wobei insbesondere in den letzten Jahren die Aptamerimmobilisierung systematisch untersucht wurde [54, 55]. Sie ist ein kritischer Schritt in der Durchführung von Aptamer-Microarray-Experimenten, da sie die Aptamerkonformation und somit die Targetbindung beeinflussen kann.

### **Aptamerimmobilisierung**

Die Aptamere können entweder kovalent an funktionalisierte Glasoberflächen gebunden oder über einen Biotin-Tag an Streptavidin-beschichtete Oberflächen gekoppelt werden. Während die Biotin-Streptavidin Bindung besonders in den ersten Microarray-Versuchen verwendet wurde, setzte sich die kovalente Immobilisierung immer mehr durch, da sie robuster gegen äußere Einflüsse wie pH-Wert- oder Temperaturschwankungen ist. Außerdem sind chemisch modifizierte Microarray-Substrate bei Raumtemperatur über Monate lagerbar, während das aufgebrauchte Streptavidin, wie für Protein typisch, denaturieren kann. Im Laufe der Jahre haben sich diverse Strategien zur chemischen Kopplung entwickelt, von denen einige die Aptamerimmobilisierung in nur einem Reaktionsschritt ermöglichen. Häufig basieren sie auf einer terminalen Aminomodifizierung des Aptamers, über die kovalente Bindungen zu N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ethern, Aldehyd-, Epoxid-, oder Aminogruppen auf der Oberfläche geknüpft werden können. Die terminale Aminogruppe wird dabei während der Aptamersynthese an das Oligonukleotid angehängt. Je nach Reaktivität der funktionellen Gruppen auf der Microarray-Oberfläche ist der Einsatz eines reaktiven Kopplungsreagenz notwendig. So werden Carboxylgruppen häufig durch Aktivierungsreagenzien wie Carbodiimiden umgesetzt und das entstehende Intermediat zum stabileren N-Hydroxysuccinimid-Ester abgefangen [75]. Diese sind zwar Hydrolyse-empfindlich, können jedoch bei reduzierter Luftfeuchtigkeit über mehrere Wochen gelagert werden. Solche voraktivierten Microarray-Substrate sind bereits kommerziell erhältlich und bieten die komfortabelste Möglichkeit zur Aptamerimmobilisierung.

Dem Problem der Aptamerinaktivierung durch Immobilisierung arbeiten die Hersteller von Microarray-Substraten entgegen, indem sie die funktionellen Gruppen nicht direkt auf die Glasoberfläche sondern an aufgebrauchte Polymere knüpfen. Hierdurch entstehen netz- oder baumartige Strukturen, die als Spacer dienen. Einen anderen Ansatz nutzen Lao *et al.*, und Franssen van Hal *et al.* die den positiven Einfluss von Spacer-Molekülen zwischen Aptamersequenz und Aminogruppe beschreiben [62]. In beiden Fällen wird sterischen Hinderungen entgegengewirkt, die entweder durch Wechselwirkungen mit der Oberfläche oder mit benachbarten Aptameren verursacht werden können [61].

Tabelle 2.1: Bereits publizierte Aptamer-basierte Microarrays zur Detektion von Proteinen.

Target	Detektion	Immobilisierung	Aptamer	LOD	Publiziert
<b>Forward Phase Assays</b>					
Multiplex aus 17 Proteinen	Fluorimetrisch per Photo-Crosslink	Succinimid/NH <sub>2</sub>	DNA	10 fM–50 pM	2004 [56]
Lysozym	Fluorimetrisch (Cy3)	Streptavidin/Biotin	RNA	70 fM	2005 [57]
5 Proteine	Fluorimetr. (Cy3, Cy5)	Streptavidin/Biotin	RNA/DNA	1 pg/mL Lysozym	2005 [58]
IgE, Thrombin	Fluorimetrisch	Aldehyd/NH <sub>2</sub>	DNA	10 ng/mL IgE	2005 [59]
Lysozym Ricin IgE Thrombin	Fluorimetrisch (Cy3)	Streptavidin/Biotin	DNA/RNA	5 pM Lysozym 500 pM Ricin 10 pM IgE 5 nM Thrombin	2006 [60]
His-Tag	Fluorimetrisch (Cy3)	Amino/aktivierte NH <sub>2</sub>	DNA	-	2008 [61]
Thrombin	Fluorimetrisch (Cy3)	Epoxid/NH <sub>2</sub>	DNA	30 pM	2009 [62]
TLR	Fluorimetrisch (Cy5)	n. d.	DNA	-	2009 [63]
His-Tag	Fluorimetrisch (Cy3)	Amino/aktivierte NH <sub>2</sub> Epoxy/NH <sub>2</sub> , Aldehyd/NH <sub>2</sub>	DNA	-	2011 [54]
His-Tag	Fluorimetrisch (Cy3)	Amino/aktivierte NH <sub>2</sub>	DNA	-	2012 [64]
Thrombin	Fluorimetr. (Cy3, Cy5)	Epoxid/NH <sub>2</sub>	DNA	-	2013 [65]
Streptavidin	Fluorimetrisch (Cy3)	verschiedene	DNA	-	2013 [55]
<b>Reverse Phase Assays</b>					
Ghrelin	Colorimetrisch (AP)	n. d.	RNA, Spiegelmer	0,2 ng/ml	2007 [66]
Hepatitis C Virus	Fluorimetrisch (QD)	Kronenether	RNA	5 ng/mL	2010 [67]
SARS	Fluorimetrisch (QD)	Kronenether	RNA	0,1 pg/mL	2011 [68]
His-Tag	Fluorimetrisch (Cy3)	Nitrocellulose	DNA	300 nM	2012 [69]
<b>Sandwich Assays</b>					
HIV-1 Tat	Fluorimetrisch	Aldehyd, NH <sub>2</sub>	RNA	-	2005 [70]
CRP*	Fluorimetrisch	Epoxid/NH <sub>2</sub>	RNA	10 ng/mL	2009 [71]
Thrombin	Fluorimetrisch (Cy5)	Succinimid/NH <sub>2</sub>	DNA	-	2011 [72]
Thrombin	Fluorimetrisch (Cy5 direkt, Cy3-Strept.)	n. d./NH <sub>2</sub>	DNA	direkt 0,8 nM; indirekt 0,2 nM	2012 [73]
VEGF, Thrombin	Fluorimetrisch (Cy5)	n. d./NH <sub>2</sub>	DNA	50 nM VEGF	2013 [74]

\* Heterogener *Sandwich* Assay bestehend aus einem Fängeraptamer und einem Detektionsantikörper

n. d.: nicht definiert

### Proteinimmobilisierung

Die Durchführung von *Reverse Phase* Microarray-Experimenten erfordert die Immobilisierung des Targetproteins auf der Microarray-Oberfläche. Um dabei die Konformation des Proteins zu erhalten und die Chipoberfläche zu vergrößern, werden in der Regel 3D-Microarray-Substrate eingesetzt. Hierzu wurden von den Herstellern verschiedene Oberflächenbeschichtungen aus Nitrocellulose [69], Polymeren [51] oder porösem Silicium [76] entwickelt, an die die Proteine nicht-kovalent binden. Im Gegensatz zu den Aptamer-modifizierten Microarrays erfolgt die Proteinimmobilisierung häufig nicht gerichtet sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen geladener und hydrophobe Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren mit der Microarray-Oberfläche [51, 52].

### Detektion

Die Detektion erfolgt in den in Tabelle 2.1 aufgelisteten Microarray-Assays ausschließlich fluorimetrisch. Im *Forward Phase* Microarray-Assay wurde dabei der Analyt mit einem Fluorophor markiert, im *Reverse Phase* und *Sandwich* Microarray-Format wurden fluoreszenzmarkierte Detektionsaptamere eingesetzt. Dabei wurden die Proben in der Regel vor Durchführung des Assays modifiziert. Lediglich Bock *et al.* entwickelten einen *Forward Phase* Assay, bei dem das unmarkierte Target vom Aptamer gebunden wurde. Stattdessen waren die Fängeraptamere mit einem photoreaktiven 5-Bromodeoxyuridin modifiziert und nach Bindung des Targets wurde dieses per Lichtexposition kovalent mit dem Target verknüpft. Nach stringentem Waschen wurden die weiterhin gebundenen Proteine mit NHS-aktiviertem Alexa555-Farbstoff fluoreszenzmarkiert. Mit dieser Methode wurde eine hohe Sensitivität des Assays erzielt. Neben klassischen organischen Fluorophoren wie Cy3, Cy5 oder Alexa555 wurden in einigen Assays Quantum Dots (QD) verwendet. Quantum Dots sind anorganische Nanokristallstrukturen mit Fluoreszenzaktivität. Sie zeichnen sich durch ihre hohe Fluoreszenzintensität und breite Absorptionsspektren aus und sind daher eine interessante Alternative zu organischen Fluorophoren [67].

Darüber hinaus wurden einige weitere Detektionsmethoden entwickelt, wie Goldnanopartikel in Verbindung mit Oberflächenplasmonresonanz oder markierungsfreie Methoden wie die Rasterkraftmikroskopie, die in Zukunft eine Alternative zur klassischen Fluoreszenzdetektion darstellen können [77].

### Multiplexing

Insgesamt nutzen nur 5 der 21 beschriebenen Assays das Potential eines Microarrays zum Multiplexing aus. Die parallele Detektion mehrerer Targets ist nicht einfach zu realisieren, da jedes Aptamer zur Ausbildung seiner typischen Faltungsstruktur auf seinen spezifischen Bindepuffer angewiesen ist. Es

ist somit schwierig, Bedingungen zu finden, die sich für alle verwendeten Aptamere eignen. Cho *et al.* ist dies mit einem universellen Bindepuffer für vier verschiedene Aptamere gelungen [60] und auch Collet *et al.* haben systematisch den Einfluss der Pufferbestandteile auf die Aptamer-Target-Bindung untersucht. Dabei wurden geeignete Detektionsbedingungen zur parallelen Analyse von fünf Proteinen gefunden [58]. Bock *et al.* hingegen selektierten die verwendeten Aptamere für den 17-plex-Assay im Voraus für diese spezifische Anwendung und konnten so die Bedingungen selbst wählen und aufeinander abstimmen [56]. Dies ist der vielversprechendste Weg, um das Multiplexing in Größenordnungen auszuweiten, wie sie mit Antikörper-Microarrays bereits erreicht werden.

### 2.3 Aptamere in der Affinitätsaufreinigung von Proteinen

Die Affinitätschromatographie ist ein effizientes und weit verbreitetes Trennverfahren zur Isolierung von Proteinen oder anderen Biomolekülen aus einer komplexen Probe. Es kann sowohl präparativ zur Aufreinigung als auch analytisch zur Detektion und Quantifizierung einer Substanz verwendet werden. Dabei beruht die Trennung auf einer spezifischen Interaktion zweier Biomoleküle wie z. B. zwischen Enzym und Substrat, Rezeptor und Ligand, Antikörper und Antigen oder Aptamer und Target. Dazu wird zunächst einer der Bindungspartner auf einer Polymermatrix, einer Kapillarwand oder auf Magnetpartikeln immobilisiert, um eine Affinitätsmatrix zu generieren. Mit Hilfe dieser Matrix wird das Targetprotein spezifisch und mit hoher Affinität aus einer komplexen Lösung gebunden, während die übrigen Probenbestandteile nicht oder kaum mit der Matrix wechselwirken. Dies ermöglicht es, das Targetprotein vom Rest der Probe zu separieren. Durch Einsatz eines Elutionspuffers werden abschließend die Interaktionen zwischen Affinitätsligand und Target minimiert, so dass das Target freigesetzt wird und die Affinitätsmatrix regeneriert werden kann [78].

Aptamere eignen sich als Affinitätsliganden in der Bioseparation von Proteinen, da sie wie in Abschnitt 2.2 dargestellt, an feste Oberflächen gekoppelt werden können, ohne ihre Targetbindekapazität zu verlieren. Da sie im Vergleich zu Antikörpern klein sind, können sie in höherer Immobilisierungsdichte auf die stationäre Matrix aufgebracht werden, was zu einer erhöhten Bindekapazität führt. Weiterhin ist die Aptamer-Target-Affinität direkt von den vorherrschenden Pufferbedingungen abhängig, was einen Ansatzpunkt zur Targetelution bietet. Im Gegensatz dazu erfordert die Immunoaffinitätschromatographie oft harsche Elutionsbedingungen, unter denen empfindliche Proteine denaturieren können [79]. Aptamere eignen sich insbesondere zur Affinitätsaufreinigung pharmazeutischer Proteine, da sie im Vergleich zu typischen Affinitätsliganden wie Protein A, Heparin oder Antikörpern chemisch hergestellt werden und somit problemlos in GMP-konformen Prozessen eingesetzt werden können [80].

Sie wurden bereits erfolgreich zur Trennung kleiner Moleküle eingesetzt, wobei es dabei sogar gelungen ist, die Trennung zweier Enantiomere zu erzielen [79]. Im Folgenden soll die Affinitätsaufreini-

gung von Proteinen genauer betrachtet werden. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über bereits etablierte Aptamer-basierte Proteintrennprozesse, wobei zwischen drei verschiedenen Systemen unterschieden wird: der Säulenchromatographie, der Kapillarchromatographie und der Magnetpartikel-basierten Aufreinigung.

**Tabelle 2.2:** Publierte Methoden zur Aptamer-basierten Affinitätsaufreinigung.

Target	Plattform	Immobilisierung	Aptamer	Elution	Publiziert
<b>Säulenchromatographie</b>					
L-Selektin-Fusionsprot.	Polyacrylamidmatrix	Streptavidin/Biotin	DNA	EDTA	1999 [81]
IgG	Sepharosematrix	NHS/NH <sub>2</sub>	RNA	EDTA	2008 [82]
His-Tag	Sepharosematrix	Streptavidin/Biotin	RNA	-	2009 [83]
Lysozym	Monolithische Säule	Aldehyd/NH <sub>2</sub>	DNA	NaClO <sub>4</sub>	2012 [84]
His-Tag	Polystyrolmatrix	Thiol/SH	RNA	DTT	2013 [85]
<b>Kapillarchromatographie</b>					
β-Lactoglobulin	Quarzglaskapillare	Sulfo-SMCC/SH	DNA	-	2001 [86]
Thrombin	Quarzglaskapillare	Sulfo-SMCC/SH	DNA	Hitze + Harnstoff	2006 [87]
Insulin	Quarzglaskapillare	Sulfo-SMCC/SH	DNA	ACN + TFA	2006 [88]
Thrombin	Quarzglaskapillare	Streptavidin/Biotin	DNA	NaClO <sub>4</sub>	2008 [89]
Insulin, IGF-2	Quarzglaskapillare	Sulfo-SMCC/SH	DNA	Harnstoff	2009 [90]
<b>Magnetpartikel</b>					
Thyroid Transkriptionsf.	Agarose-MP	Streptavidin/Biotin	DNA	DNase	2003 [91]
HCV RNA-Polymerase	PEG-MP	NHS/NH <sub>2</sub>	RNA	Photoelution	2004 [92]
<i>T. aquaticus</i> DNA-Polymerase	Acrylat-MP	Aktiv. Amino/SH	DNA	NaCl + pH-Wert	2007 [93]
MutS	Magnetpartikel	Streptavidin/Biotin	DNA	Harnstoff	2009 [45]
PDGF	Magnetpartikel	Streptavidin/Biotin	DNA	Hitze	2010 [46]
His-Tag	Silan-MP	Amino/Aktiv. NH <sub>2</sub>	DNA	Imidazol	2011 [94]

## Chromatographiesysteme

Aptamer-basierte säulenchromatographische Methoden können zur präparativen Trennung von Proteinen theoretisch auch im großen Maßstab eingesetzt werden. Sie eignen sich somit für die Aufreinigung rekombinant hergestellter Proteine für die pharmazeutische oder diagnostische Anwendung. In bereits etablierten Verfahren wurden die Aptamere hierzu an funktionalisierte Säulenmaterialien aus Sepharose [82, 83], Polyacrylamid [81], Polystyrol [85] oder Monolithen [84] gekoppelt. Weiterhin wäre es denkbar, Membranadsorber, die bereits zur klassischen Ionenaustauschchromatographie verwendet werden, mit Aptameren zu funktionalisieren [95, 96]. Während des Trennvorgangs wird

das entweder poröse oder polymere Säulenmaterial von der Analytlösung durchflossen, wobei es zu Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem Aptamer und dem Target kommt.

Die Kapillarchromatographie dient der analytischen Trennung von Proteinen mit hohen Trennauflösungen und vergleichsweise kurzen Analysezeiten, wobei die Beladungskapazität gering ist. In Kombination mit sensitiven Detektionsverfahren wie der Fluoreszenzdetektion ist die Quantifizierung des Proteins möglich. Die Kopplung des Chromatographiesystems mit einem Massenspektrometer erlaubt weiterhin die Identifizierung des Analyten [87]. Zur Herstellung der Aptamer-Affinitätsmatrix werden die Aptamere an der Innenwand einer typischerweise aus Quarzglas bestehenden chemisch modifizierten Kapillare immobilisiert. Der Durchmesser der zur Aptamer-Affinitätschromatographie verwendeten Kapillaren betrug 20–100  $\mu\text{m}$  und die Länge 40–47 cm [87, 89]. Die Kapillare wird von der Analytlösung durchflossen, wobei es an den Kapillarwänden zu Wechselwirkungen mit dem immobilisierten Aptamer kommt. In der Regel wird der Analytfluss durch Anlegen eines Überdrucks induziert. Rehder *et al.* verwenden hingegen die Kapillarelektrochromatographie, bei der analog zur Kapillarelektrophorese ein elektroosmotischer Fluss induziert wird [86].

Die Magnetpartikel-basierte Separation von Proteinen erfordert im Vergleich zu den chromatographischen Verfahren einen geringeren apparativen Aufwand. Die Magnetpartikel werden dabei mit den Aptameren funktionalisiert und in der Analytlösung suspendiert, wodurch sie in Kontakt mit ihrem Targetprotein kommen. Die Abtrennung der Analytlösung per magnetischer Separation ist effizient und erlaubt es mit geringen Analytvolumina im  $\mu\text{L}$ -Maßstab zu arbeiten. Daher eignen sich Aptamer-gekoppelte Magnetpartikel als Modellsysteme für die flüssigchromatographische Anwendung. Sie wurden bereits erfolgreich zur Charakterisierung der Aptameraktivität nach ihrer Immobilisierung oder zum Screening nach geeigneten Elutionsbedingungen eingesetzt [94, 93] und können somit der Optimierung der Aptamer-basierten Affinitätsaufreinigungsverfahren beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse können anschließend auf die Flüssigchromatographie übertragen werden. Darüber hinaus finden Magnetpartikel Anwendung in der Analytik. Die Firma Bio-Rad verwendet beispielsweise in ihrem Multiplex-Immunoassay-System „Bio-plex® MagPix“ Antikörper-modifizierte Magnetpartikel als Affinitätsmatrix. Weiterhin bieten sie Antikörper-freie Magnetpartikel an, die vom Anwender mit beliebigen Affinitätsliganden wie. z. B. Aptameren funktionalisiert werden können [97].

### **Aptamerimmobilisierung**

Die verwendeten Strategien zur chemischen Kopplung der Aptamere ähneln denen zur Immobilisierung von Aptameren auf Microarray-Substraten. In einigen Fällen wurde die nicht-kovalente Bindung über Streptavidin-modifizierte Oberflächen und Biotin-modifizierte Aptamere gewählt. Für Anwendungen in der Lebensmitteltechnologie oder zur Aufreinigung pharmazeutischer Proteine muss si-

chergestellt werden, dass der Ligand während der Aufreinigung nicht von der Säule gespült wird [78]. Diese Gefahr besteht beim Streptavidin/Biotin-System besonders in Folge der Säulen-Regeneration unter sauren oder basischen Bedingungen. Die kovalente Bindung der Aptamere ist somit auch in der Affinitätsaufreinigung das Mittel der Wahl. Daher wurden auch hier diverse Kopplungsstrategien auf Basis chemisch modifizierter Oberflächen und Amino- oder thiolmodifizierter Aptamere entwickelt.

### **Elution des Targets**

Die Targetelution spielt in der Affinitätschromatographie eine entscheidende Rolle, da sie zum einen die Wiederverwendung der Affinitätsmatrix und zum anderen die Gewinnung des gereinigten Targetproteins ermöglicht. Wie in Tabelle 2.2 zusammengefasst, wurden diverse Strategien zur Targetelution verfolgt. Darunter sind einige, die sowohl das Aptamer als auch das Targetprotein denaturieren, wie z.B. Hitze, Harnstoff, Acetonitril/Trifluoressigsäure, DTT oder Natriumperchlorat. Sie eignen sich für die analytische Anwendung, da das Protein nach der Detektion verworfen werden kann. Das Aptamer kann dagegen nach der Denaturierung wieder regeneriert und somit wiederverwendet werden [98]. Im Gegensatz dazu stellen die Verwendung von EDTA und Natriumchlorid interessante Strategien zur Proteinelution für präparative Anwendungen dar. Das EDTA chelatisiert dabei zweiwertige Kationen im Bindepuffer und inhibiert so Aptamerfaltungen, die auf die Anwesenheit dieser Ionen angewiesen sind [82] und das NaCl stört unspezifisch die Bindung zwischen Aptamer und Target [78]. In einigen Fällen ist die Elution des Targets durch kompetitive Verdrängung aus der Binde-tasche des Aptamers möglich, wie z. B. der Verdrängung von Histidin-Seitenketten durch Imidazol. Analog zur klassischen IMAC wurde diese Elutionsmethode bereits in Kombination mit Aptamer-matrices etabliert [94]. Die optimale Strategie zur Targetelution ist von der Aptamer-Target-Bindung, der Stabilität des Targetproteins und der gewünschten Anwendung abhängig und muss für jeden Prozess einzeln identifiziert werden. Dabei spielt die Stabilität der Aptamer-Affinitätsmatrix nur eine untergeordnete Rolle, da sie in der Regel deutlich größer ist als die der Proteine [91]. Dies gilt insbesondere bei Verwendung von DNA-Aptameren, die kovalent an das Trägermaterial gebunden sind.

## **2.4 Aptamere gegen den Vaskulären Endothelilalen Wachstumsfaktor (VEGF)**

### **2.4.1 Die Vaskulären Endotheliale Wachstumsfaktoren**

Die Vaskulären Endotheliale Wachstumsfaktoren sind eine Proteinfamilie, die als Signalmoleküle die Angiogenese (Wachstum von Blutgefäßen) und Vaskulogenese (Neubildung von Blutgefäßen) während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus stimulieren. Das VEGF wirkt dabei als

Hormon und bindet als Ligand an spezifische VEGF-Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert werden. Zur Proteinfamilie gehören sieben verschiedene Wachstumsfaktorproteine: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und -F sowie der Plazentawachstumsfaktor PLGF [99].

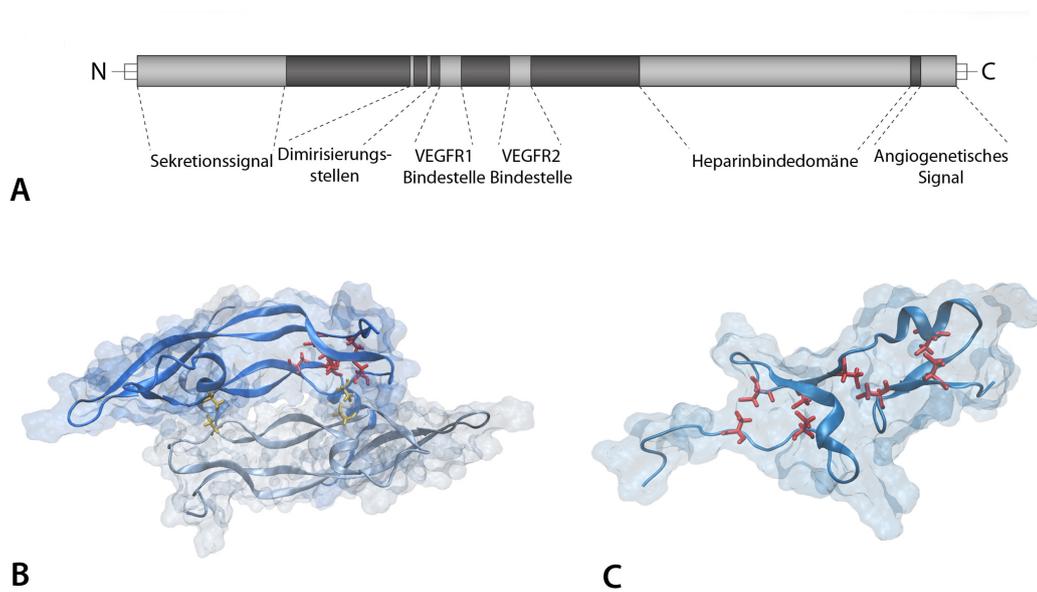
### **Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A)**

Das VEGF-A ist der Hauptregulator der Angiogenese und Gefäßpermeabilität im adulten Organismus [99]. Es handelt sich um ein homodimeres Protein, dessen Aminosäuresequenz vom VEGF-A-Gen codiert wird, welches auf Chromosom 6 des menschlichen Genoms liegt und aus insgesamt neun Exons besteht. Durch alternatives Splicing im Rahmen der RNA-Prozessierung nach der Transkription werden einige der Exons miteinander kombiniert, so dass aus dem einen VEGF-A-Gen diverse verschiedene mRNAs hervorgehen. Diese codieren jeweils für eine VEGF-A-Isoform, wobei die längste Isoform, das VEGF-A<sub>206</sub>, 232 Aminosäuren (206 AS des reifen Proteins + 26 AS Signalsequenz) lang ist und alle neun Exons beinhaltet. Die kürzeste Form ist das VEGF-A<sub>121</sub>. Als Isoform mit der höchsten biologischen Relevanz wurde das VEGF-A<sub>165</sub> identifiziert [100], das im Rahmen dieser Arbeit als Modellprotein dient.

### **Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor A<sub>165</sub> (VEGF-A<sub>165</sub>)**

Das VEGF-A<sub>165</sub> wird von den Exons 1–5 sowie 7 und 8 codiert. Während der Translation entsteht dabei zunächst ein Präpeptid mit einer Länge von 191 Aminosäuren, das sich aus einer N-terminalen Signalsequenz und dem 165 Aminosäuren langen VEGF-Peptid zusammensetzt. Die Peptidstruktur ist in Abbildung 2.6 A schematisch dargestellt. Sie beinhaltet neben der Signalsequenz zwei Dimerisierungsregionen, je eine Rezeptorbindestelle für die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 und eine Heparinbinde-region. Die letzten sechs Aminosäuren am C-Terminus des Peptids entsprechen beim VEGF-A<sub>165</sub> dem angiogenetischen Typ; es existiert jedoch ebenfalls ein Gegenspieler des antiangiogenetischen Typs (VEGF-A<sub>165b</sub>), der in der Regulation der Signalwege eine wichtige Rolle spielt [101]. Die N-terminale Signalsequenz vermittelt die Sekretion des VEGF-A<sub>165</sub> aus der Zelle in den extrazellulären Raum und wird während des Sekretionsprozesses abgespalten [102]. Es verbleiben die reifen VEGF-A<sub>165</sub>-Peptide, von denen je zwei die biologisch aktive Konformation eines Homodimers bilden. Während der Proteinprozessierung wird das VEGF-A<sub>165</sub> unter bestimmten Bedingungen zusätzlich glycosyliert, wobei nachgewiesen wurde, dass diese Glycosylierung nicht essentiell für seine biologische Aktivität ist [103].

Vereinfacht werden die Aminosäuren A<sub>1</sub>–R<sub>110</sub> des VEGF-A<sub>165</sub> als Rezeptorbindedomäne und die Region A<sub>111</sub>–R<sub>165</sub> als Heparinbindedomäne des Proteins bezeichnet. Sie entstehen durch Spaltung des VEGF-A<sub>165</sub> mit Plasmin, wonach die Rezeptorbindedomäne als Homodimer und die Heparinbindedomänen in Form von Monomeren vorliegen [104]. Da es bislang nicht gelungen ist, das VEGF-A<sub>165</sub>



**Abbildung 2.6:** Peptid- und Proteinstruktur des VEGF- $A_{165}$ .

A: Peptidstruktur mit verschiedenen Domänen. Modifiziert nach [101] B: Kristallstruktur der dimeren Rezeptorbindedomäne nach PDB:1KAT dargestellt mit VMD 1.91. Die Disulfidbrücken der Cysteinknoten-Motivs sind rot dargestellt, die Disulfidbrücken zur Bildung des Dimers in gelb. C: Kristallstruktur der monomeren Heparinbindedomäne nach PDB:1KMX dargestellt mit VMD 1.91. Die stabilisierenden Disulfidbrücken sind rot dargestellt.

als Gesamtprotein zu kristallisieren, wurde die Proteinkonformation der Rezeptor- und Heparinbindedomäne einzeln betrachtet. Die Kristallstrukturen der dimeren Rezeptorbindedomäne und der monomeren Heparinbindedomäne sind in Abbildung 2.6 B und C dargestellt.

Die Heparinbindedomäne besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblättern und zwei kurzen helikalen Bereichen, deren Konformation durch vier intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird. Sie hat keine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten Heparinbindedomänen und stellt somit eine eigene Klasse dar. Durch Berechnung von Oberflächenladungen wurde innerhalb der Heparinbindedomäne ein Cluster positiv geladener Aminosäureseitenketten identifiziert, welches möglicherweise die Interaktion mit dem Heparin vermittelt, das eine hohe Dichte negativer Ladungen aufweist [104].

Charakterisierungen der Rezeptorbindedomäne ergaben, dass das VEGF- $A_{165}$  der Superfamilie der Cysteinknotenproteine zugeordnet werden kann. Jedes Monomer besteht aus einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt an dessen Ende sich das Cysteinknotenmotiv mit der typischen Anordnung dreier Disulfidbrücken befindet. Zwei der Disulfidbrücken bilden eine Ringstruktur, die von der dritten Disulfidbrücke durchkreuzt wird. Die Monomere der Rezeptorbindedomäne werden weiterhin über zwei Disulfidbrücken antiparallel zueinander zum Homodimer verknüpft [105]. Analysen der VEGF-Rezeptor-Bindung ergaben, dass sich die Konformation des VEGF- $A_{165}$  durch Bindung an den VEGF-Rezeptor 1 kaum verändert [106]. Die Bindung erfolgt überwiegend über hydrophobe Wechselwir-

kungen, wobei die Binderegion am VEGF- $A_{165}$  und am Rezeptor identifiziert wurden [107].

Bei den VEGF Rezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die in der Zellmembran von Endothelzellen vorkommen. Das VEGF- $A_{165}$  bindet an die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 und löst in Folge dessen komplexe intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur Stimulation der Zellproliferation und -migration führen. Darüber hinaus beeinflussen sie die Zell-Zell-Kommunikation der Endothelzellen [108]. Die VEGF- $A_{165}$ -Signalwege steuern auf diese Weise die Angiogenese und Vasculogenese, die besonders in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt, um die Nährstoffversorgung des wachsenden Embryos zu gewährleisten. Im adulten Organismus wird ein basales Level VEGF-A vermutlich zum Erhalt der bestehenden Blutgefäße benötigt, während erhöhte VEGF-A-Konzentrationen zur Wundheilung und Geweberegeneration nach Verletzungen beitragen [99]. Die Regulation des VEGF-A-Spiegels ist zum Erhalt eines gesunden Organismus unerlässlich. Eine Überexpression kann beispielsweise zur Entwicklung von Arteriosklerose oder zu verstärktem Tumorwachstum beitragen, was das VEGF-A zu einem möglichen Ansatzpunkt in der Krebstherapie macht [100].

Im Folgenden wird auf die Bezeichnung »- $A_{165}$ « verzichtet, so dass sich die Bezeichnung VEGF immer auf das VEGF-A in seiner Isoform 165 bezieht, andere Isoformen sind mit dem entsprechenden Index gekennzeichnet.

## 2.4.2 VEGF-bindende Aptamere

Aufgrund seiner medizinischen Bedeutung ist das VEGF ein interessantes Aptamertarget. Seit der Entdeckung des ersten VEGF-bindenden Aptamers im Jahr 1994 wurden bis heute elf weitere Aptamer-Selektionsprozesse mit VEGF als Targetprotein publiziert. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

**Tabelle 2.3:** Publierte SELEX-Prozesse zur Selektion VEGF-bindender Aptamere.

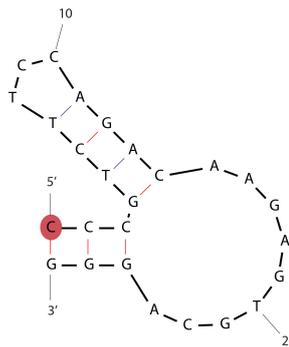
Typ	Anzahl Sequenzen	Beispielaptamer	$K_D$ [nM]	Spezifität	Veröffentlicht	Literatur
RNA	12		10–182	unbekannt	1994	[109]
RNA	6		0,14–320	unbekannt	1995	[110]
DNA	1	33t5	0,7	unbekannt	1998/2008	[111, 112, 113]
RNA	46	NX1838 (Macugen®)	0,002–9	HBD	1998	[114, 115]
RNA	3		1–2	HBD	2005	[116]
DNA	2	VEa5, Del5-1, SL2B	130–500	HBD	2008	[117, 118, 119]
DNA	2	V7t1	1,4–20	RBD	2010	[28, 120]
DNA	2		10–170	HBD	2013	[121]
DNA	6		21–164	unbekannt	2013	[122]
DNA	9		0,0006–3,4	unbekannt	2013	[123]
DNA	4		1,4	HBD	2014	[124]

Viele der VEGF-bindenden Aptamere wurden nach ihrer Selektion genauer charakterisiert, um Bindeaffinitäten (siehe Tabelle 2.3) und -spezifitäten zu bestimmen [117] oder Target-bindende Bereiche zu identifizieren [111, 119]. Für das im Jahr 2010 selektierte Aptamer V7t1 wurde darüber hinaus per NMR-Spektroskopie die Faltungsstruktur aufgeklärt, wobei eine G-Quadruplex als zentrales Strukturelement identifiziert wurde [28]. Im experimentellen Teil dieser Arbeit werden bereits publizierte VEGF-bindende DNA-Aptamere eingesetzt, die auf Basis ihrer Affinität zum VEGF ausgewählt wurden. Dazu wurde aus jedem der drei zum Auswahlzeitpunkt publizierten Selektionsprozesse das Aptamer mit der höchsten Affinität zum VEGF ausgewählt (33t5, Del5-1, V7t1). Weiterhin wurde das SL2B als vielversprechende Variante des Aptamers Del5-1 getestet. Die vier Aptamerkandidaten werden im Folgenden genauer beschrieben.

### Das Aptamer 33t5

Das Aptamer 33t5 wurde von Gold und Janjic in Jahr 1998 selektiert und seine Sequenz im US-Patent 5811533 geschützt [112]. Zehn Jahre später wurde eine auf 25 Nukleotide verkürzte Form des Aptamers von Potty *et al.* bezüglich seiner Bindung zum VEGF charakterisiert [111]. Die VEGF-Bindeaffinität in Lösung wurde per Fluoreszenzpolarisation und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert, die Bindung des VEGF an immobilisierte Aptamere wurde per Oberflächenplasmonresonanz (SPR) untersucht. Die Analysen per Fluoreszenzpolarisation (FP) zeigten, dass das Aptamer das VEGF in einer eins-zu-eins Stöchiometrie bindet, also ein einzelnes Aptamer an das VEGF-Homodimer bindet. Die Aptamer-VEGF-Interaktion wird dabei stark vom Bindepuffer beeinflusst, wobei die Bindeaffinität mit steigender Salzkonzentration im Puffer abnimmt. Während die ermittelte Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) im Aptamer-Selektionspuffer PBS 403,6 nM betrug, lag sie in 20 mM TRIS, pH 7,4 bei 1,9 nM und stieg durch Zugabe von 200 mM NaCl auf 855 nM an. Der Zusatz von nur 5 mM Magnesiumchlorid zum Bindepuffer PBS steigerte den  $K_D$ -Wert um das 2,6-fache. Die Dissoziationskonstante der 33t5-VEGF-Bindung in PBS wurde zusätzlich per ITC ( $K_D = 40,5$  nM) und SPR ( $K_D = 10,9$  nM) bestimmt und betrug laut dieser Messungen weniger als ein Zehntel der per FP bestimmten  $K_D$  [111].

Zur Optimierung der Bindeaffinität, wurde die Aptamersequenz des 33t5 am 5'-Terminus um ein Cytosin verlängert, so dass sie der in Abbildung 2.7 dargestellten Sequenz entsprach. Hierdurch konnte die zur Bindung von VEGF notwendige Aptamerkonformation stabilisiert werden, so dass die per SPR bestimmte  $K_D$  auf 0,9 nM sank [111]. Die thermodynamisch bevorzugte Sekundärstruktur des Aptamers wurde mit Mfold [125] berechnet und ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Potty *et al.* nehmen an, dass das Aptamer 33t5 mit der Loopstruktur A15-A23 an das VEGF bindet und diese Loopstruktur durch die doppelsträngigen Bereiche stabilisiert wird. Vermutlich ist für die VEGF-Bindung eine offene Konformation des Loops notwendig [111]. Diese Theorie wird durch Analysen der Aptamer-



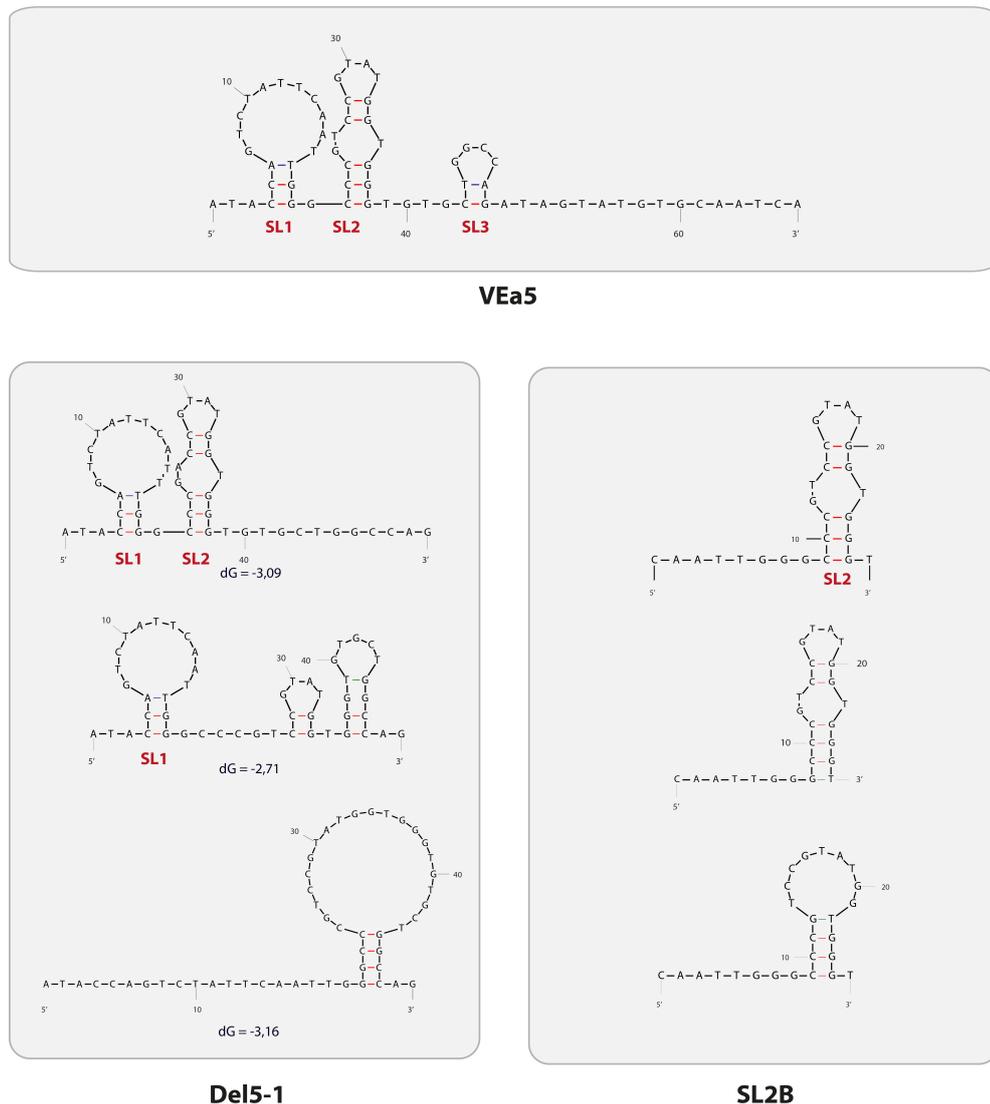
**Abbildung 2.7:** Thermodynamisch bevorzugte Sekundärstruktur des 33t5 berechnet mit Mfold [125]. Das zur Stabilisierung der Aptamerkonformation eingefügte Cytosin ist rot markiert.

konformation per Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (*Single-molecule fluorescence resonance energy transfer*, SMFRET) gestützt. Es wurde gezeigt, dass das freie Aptamer bevorzugt eine geschlossene Loop-Konformation einnimmt, die durch divalente Ionen wie  $Mg^{2+}$  stabilisiert wird. Durch Verringerung der  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen im Bindepuffer nimmt das Aptamer vermehrt die weniger bevorzugte offene Konformation ein. Auch die Bindung des VEGF drängt das Aptamer in eine offenere und damit prinzipiell ungünstigere Konformation, die durch Anwesenheit des VEGF stabilisiert wird [113].

### Die Aptamere VEa5, Del5-1 und SL2B

Das Aptamer VEa5 wurde 2008 von Hasegawa *et al.* auf Basis der Aptamer-Blotting-Methode selektiert und seine Bindeaffinität zum VEGF wurde per SPR analysiert. Für das 63-Nukleotid-Aptamer wurde ein  $K_D$ -Wert von 130 nM ermittelt und seine thermodynamisch günstigste Sekundärstruktur wurde vorhergesagt. Sie ist in Abbildung 2.8 dargestellt und besteht aus insgesamt drei *Stem-Loop*-Strukturen, die vermutlich an der Aptamer-Target-Bindung beteiligt sind. Das Aptamer wurde auf die *Stem-Loop*-bildenden Nukleotide verkürzt und als Del5-1 bezeichnet. Die per Mfold [125] berechneten thermodynamisch bevorzugten Sekundärstrukturen des Del5-1 sind in Abbildung 2.8 dargestellt. Per Dot-Blot-Analyse wurde die Aptamer-VEGF-Bindung des Del5-1 nachgewiesen [118]. 2013 bestimmten Kanakaraja *et al.* die Dissoziationskonstante per FP-Analyse. Es wurde ein  $K_D$ -Wert von 20,7 nM für die Interaktion im Aptamer-Selektionspuffer ermittelt. Vergleichsexperimente mit einer Zufalls-DNA-Sequenz zeigten, dass diese das VEGF mit einer geringfügig schwächeren Affinität bindet. Sowohl die Affinität des Aptamers als auch die der Zufalls-DNA zum VEGF sind von der Ionenstärke des Puffers abhängig und nehmen mit steigender NaCl-Konzentration ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die Del5-1-VEGF-Bindung auf nur gering sequenzspezifischen elektrostatischen Interaktionen beruht. Das VEGF besitzt einen leicht basischen isoelektrischen Punkt ( $pI = 7,6$ ) und trägt im Aptamerbindepuffer ( $pH 7$ ) eine positive Nettoladung. Die positiv geladenen Ami-

## 2.4 Aptamere gegen den Vaskulären Endothelilalen Wachstumsfaktor (VEGF)



**Abbildung 2.8:** Thermodynamisch begünstigte Sekundärstrukturen der Aptamere VEa5, Del5-1 und SL2B berechnet mit Mfold [125].

nosäureseitenketten insbesondere innerhalb des Clusters der Heparinbindedomäne könnten dabei mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Aptamer-Rückgrats wechselwirken. Zum basischen Vergleichsprotein Lysozym traten hingegen keine unspezifischen Bindungen des Del5-1 auf [117].

Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte ebenfalls mit dem Ursprungsaptamer VEa5 mit dem Ziel, die VEGF-bindenden Nukleotide des Aptamers zu identifizieren [119]. Dazu wurde die Aptamersequenz in unterschiedliche Fragmente gespalten und für jedes die Bindung an das immobilisierte VEGF per SPR untersucht. Es wurde festgestellt, dass der in Abbildung 2.8 markierte *Stem-Loop 2* (SL2) eine hohe Affinität zum VEGF aufweist, während der isolierte *Stem-Loop 1* (SL1) keinerlei Bindung zeigte. Er ist jedoch in der Lage, die VEGF-Bindung von SL2 zu unterstützen. Die höchste Bindeaffinität der analysierten Sequenzen wies somit das Aptamer SL2B auf, das aus der SL2 und einigen Nukleo-

tiden von SL1 besteht. Es wurde ein  $K_D$ -Wert von 0,5 nM ermittelt [119] und die thermodynamisch begünstigten Sekundärstrukturen wurden berechnet (Abbildung 2.8).

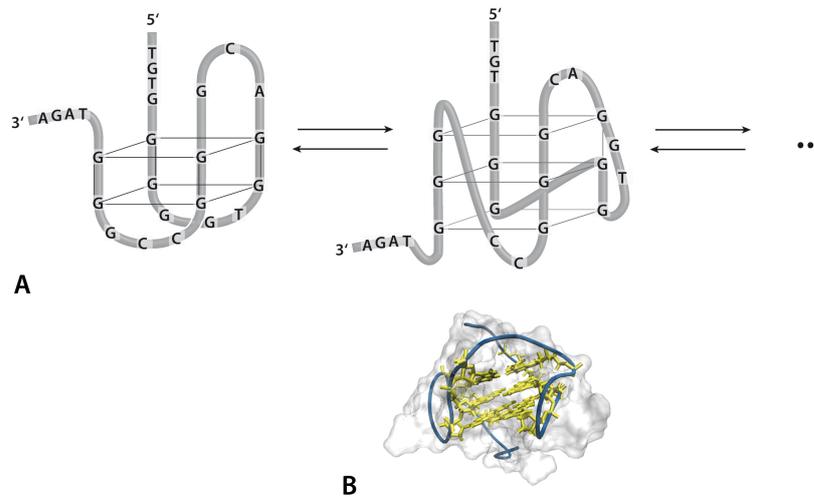
### Das Aptamer V7t1

Das Aptamer V7t1 wurde 2010 von Nonaka *et al.* selektiert und ist das einzige bekannte VEGF-bindende Aptamer, das gegen die Rezeptorbindedomäne des VEGF gerichtet ist. Um dies zu erreichen, wurde im Aptamer-Selektionsprozess das VEGF in seiner Isoform 121, die keine Heparinbindedomäne besitzt, als Targetprotein eingesetzt. Nach Abschluss des SELEX-Prozesses wurde das 63 Nukleotid-lange Aptamer Vap7 identifiziert, das sowohl das VEGF<sub>165</sub> als auch das VEGF<sub>121</sub> bindet. Seine Bindspezifität zum VEGF wurde nachgewiesen und per SPR wurde ein  $K_D$ -Wert von 20 nM ermittelt. Im Gegensatz dazu wurde keine Bindung an die Kontrollproteine Bovines Serum Albumin (BSA), Thyroglobulin und Pyrrolochinolinchinon-Glucose-Dehydrogenase beobachtet. Durch seinen hohen Guanin-Anteil faltet sich das Aptamer in eine G-Quadruplex, die als Protein-bindendes Strukturmotiv identifiziert wurde. Um mögliche konkurrierende Aptamerfaltungen auszuschließen und somit die VEGF-Bindung zu optimieren, wurde das Vap7 auf diese G-Quadruplex-bildende Sequenz reduziert, woraus das aus 25 Nukleotiden bestehende Aptamer V7t1 resultierte. Der per SPR ermittelte  $K_D$ -Wert reduzierte sich hierdurch auf 1,4 nM. Auf Basis theoretischer Strukturvorhersagen und Analysen per Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde vermutet, dass sich das Aptamer in eine parallele G-Quadruplex-Struktur faltet, die in Abbildung 2.9 A links schematisch dargestellt ist [120].

Strukturanalysen zeigten jedoch, dass das Aptamer mehrere verschiedene Quadruplexstrukturen annimmt, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Durch Ersetzen einiger DNA-Nukleotide des V7t1 durch entsprechende 2'-4' verbrückte *Locked-Nucleic-Acid*- oder hochflexible *Unlocked-Nucleic-Acid*-Nukleotide, konnte eine dieser Quadruplexstrukturen stabilisiert werden und ihre Struktur per NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden [28]. Es ergab sich die in Abbildung 2.9 A (rechts) schematisch dargestellte G-Quadruplex, die aus drei Quartett-Ebenen besteht. Abbildung 2.9 B zeigt die Kristallstruktur dieser G-Quadruplex, wobei die Quadruplex-bildenden Guanine hervorgehoben sind. Wie viele weitere G-Quadruplex-Strukturen vom V7t1 gebildet werden und welche die höchste Affinität zum VEGF besitzt, ist bislang unbekannt.

### Anwendung VEGF-bindender Aptamere

Anwendung finden die VEGF-bindenden Aptamere überwiegend in der Diagnostik, wobei sie zur Quantifizierung des VEGF im Blut oder Gewebe dienen sollen. Die Konzentration des VEGF im



**Abbildung 2.9:** Mögliche Sekundärstrukturen des Aptamers V7t1.

A: Schematische Darstellung zweier möglicher Quadruplexstrukturen des Aptamers V7t1: Dargestellt ist die von Nonaka *et al.* postulierte G-Quadruplexstruktur (links) bestehend aus zwei Quartett-Ebenen [120] und die von Marusic *et al.* durch Einführung modifizierter Nukleotide stabilisierte G-Quadruplex mit drei Quartett-Ebenen (Mitte) [28]. Darüber hinaus kann das Aptamer weitere Quadruplex-Strukturen einnehmen.

B: Struktur der von Marusic *et al.* stabilisierten Aptamerkonformation des V7t1 in Lösung. In blau ist das Aptamer-Rückgrat schematisch dargestellt, in gelb sind die Quadruplex-bildenden Guanine eingezeichnet.

Blutplasma eines gesunden Patienten beträgt ca. 25 pg/mL (0,54 pM). Sie kann in Folge von metastasierenden Krebserkrankungen auf über 150 pg/mL ansteigen und somit ein Indikator für eine fortschreitende Krebserkrankung sein [126]. Da die zu detektierenden VEGF-Konzentrationen im Blut sehr gering sind, erfordert die Diagnostik sensitive Detektionsassays, die möglicherweise mit Aptamern realisiert werden können. Hierzu wurden in der Vergangenheit diverse Detektionssysteme entwickelt, wobei neben Aptamer-Microarrays [127, 74, 128] und analytischen VEGF-Separationssystemen [129, 130] vor allem Aptasensoren eingesetzt wurden. Hier wurden sowohl optisch-basierte [131, 132, 133, 134, 135] als auch elektrochemische Systeme [136, 137, 138, 139, 140, 141, 142] entwickelt. Die Sensitivität der Assays variiert stark, wobei einige bereits physiologisch relevante Nachweisgrenzen erreichten [131, 140, 141].

Eine weitere Anwendung VEGF-bindender Aptamere ist der Einsatz als Therapeutikum. Das RNA-Aptamer Pegaptanib oder NX1838, das 1998 von Ruckman *et al.* selektiert wurde [114], bindet an die Heparinbindedomäne des VEGF und inhibiert damit die Wechselwirkung des VEGF mit den VEGF-Rezeptoren. In Folge dessen inhibiert es die Angiogenese und erzielt somit die gleiche Wirkung wie typische Krebsmedikamente [143]. Seit 2004 ist das Aptamer von der FDA zur Behandlung der altersabhängigen Makula-Degeneration zugelassen und wird unter dem Markennamen Macugen® vertrieben. Um den schnellen enzymatischen Abbau *in vivo* zu verhindern, enthält das Pegaptanib 2'-Fluoropyrimidine und einige 2'-Methoxy-Nukleotide, die den Angriff der Nukleasen inhibieren.

## 2.4 Aptamere gegen den Vaskulären Endothelilalen Wachstumsfaktor (VEGF)

Weiterhin wurde durch Kopplung des Aptamers an Polyethylenglycol (PEG) die Biostabilität erhöht [20]. Auf diese Weise wurde ein therapeutisch wirksames Oligonukleotid entwickelt, das ein Vorreiter für weitere Aptamer-basierte Therapien sein könnte.

## 3 Bereitstellung des Targetproteins VEGF

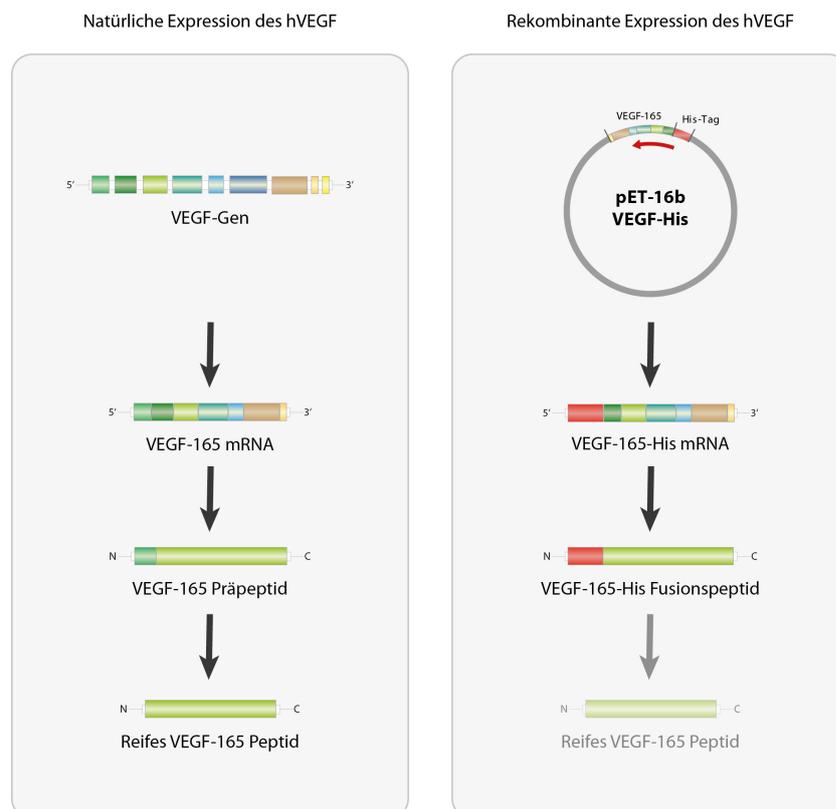
Ziel des praktischen Teils dieser Arbeit ist die Entwicklung Aptamer-basierter Methoden zur Proteindetektion und -aufreinigung, die in Kapitel 5 und Kapitel 6 beschrieben werden. Der humane Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor VEGF-A in seiner Isoform 165 (VEGF-A<sub>165</sub>) dient als Modellprotein für alle im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden. Zur Vereinfachung wird er im Folgenden mit VEGF bezeichnet. Um genügend Proteinmaterial zu Verfügung zu stellen, wurde zunächst das VEGF rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert, chromatographisch aufgereinigt und es wurde ein biologischer Aktivitätstest durchgeführt. Dies ist den folgenden Abschnitten beschrieben. In Kapitel 4 wird die Auswahl der VEGF-bindenden Aptamere erläutert und die Aptamer-VEGF-Bindung in Lösung untersucht. Das VEGF und die VEGF-bindenden Aptamere wurden im Anschluss zur Entwicklung von Aptamer-Microarrays zur VEGF-Detektion (Kapitel 5) und einer Aptamer-basierten Aufreinigungsstrategie des VEGF (Kapitel 6) eingesetzt. Die Protokolle zur Durchführung der Experimente finden sich in Anhang B.

### 3.1 Klonierung

Da die rekombinante Expression glycosylierter Proteine nur mittels eukaryotischer Zellen wie z. B. mancher Hefen oder CHO-Zellen möglich und damit sehr aufwändig ist, wurde für die rekombinante VEGF-Produktion auf die Proteinglycosylierung verzichtet. Als Expressionswirt wurde das Bakterium *E. coli* gewählt, das sich durch einfache und kostengünstige Kultivierungsbedingungen und hohe Proteinausbeuten auszeichnet. Da Prokaryoten wie *E. coli* humane Sekretionssignale nicht erkennen und die Signalsequenz nicht vom Peptid abspalten können, wurde nur die genetische Information, die für das reife VEGF<sub>165</sub>-Peptid codiert, in das Bakterium eingebracht. Dazu wurde ein künstliches Gen synthetisiert, das für einen N-terminalen His-Tag, eine enzymatische Spaltstelle und das VEGF<sub>165</sub>-Peptid (Teile des Exons 2, Exon 3–5, 7, 8) codiert. Das Gen wurde in einen pET Expressionsvektor kloniert und der Vektor in den kompetenten *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Im Anschluss wurde das synthetische Gen als 185 Aminosäuren langes Fusionspeptid exprimiert und mit Hilfe des His-Tags aufgereinigt. Die enzymatische Spaltstelle ermöglicht es, mit der Protease Xa den His-Tag proteolytisch vom VEGF<sub>165</sub> abzuspalten. Diese Spaltstelle ist so angeordnet, dass nach der enzymatischen Spaltung keine zusätzliche Aminosäure mehr am VEGF<sub>165</sub>-Peptid verbleibt, so dass

die Proteinsequenz exakt der des reifen humanen VEGF<sub>165</sub> entspricht. Die natürliche Expression des humanen VEGF<sub>165</sub> sowie die rekombinante Expression in *E. coli* sind in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

Im Folgenden wird auf die Verwendung des Indexes <sub>165</sub> verzichtet, so dass sich die Bezeichnung VEGF immer die Isoform 165 bezieht.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der natürlichen Expression des humanen VEGF<sub>165</sub>, dessen Gensequenz unter NCBI Accession Number (Acc-No.): NM\_001171626.1 verfügbar ist, sowie die rekombinante Expression in *E. coli*.

### 3.1.1 Gensynthese

Als Grundlage zur Konstruktion des synthetischen VEGF-Gens dienten die proteincodierenden Bereiche der humanen Gensequenz (NCBI-Acc-No.: M32977.1), die anschließend für die rekombinante Expression in *E. coli* modifiziert wurden. Da im genetischen Code 64 Codons aber nur 20 verschiedene Aminosäuren verankert sind, können einige Aminosäuren von mehreren Codons codiert werden. Die korrespondierenden tRNAs werden jedoch nicht in allen Organismen in gleicher Häufigkeit exprimiert. Um die im humanen Organismus synthetisierten tRNAs mit den in *E. coli* gebildeten abzugleichen, wurde eine Codon-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die im humanen VEGF-Gen verwendeten Basentriplette mit einer *Codon Usage* Tabelle für den Expressionswirten *E. coli* K12 [144]

abgeglichen. Die Analyse zeigte, dass in der humanen VEGF-Gensequenz Codons genutzt wurden, deren korrespondierende tRNAs in *E. coli* kaum oder gar nicht synthetisiert werden. Da dieser tRNA-Mangel zur Verzögerung oder zum Abbruch der rekombinanten Proteinsynthese führen würde, wurden diese seltenen Codons durch in *E. coli* häufiger vorkommende Codons ersetzt. Insgesamt wurden 107 Basenaustausche in 95 Codons vorgenommen, wie im Sequenzalignment in Abbildung 3.2 dargestellt ist.

hVEGF165	1	GCACCCATGSCAGAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCATCAGCGCAGCTACTGCCA
Codon-opt.	1	GCCTCCGATGSCGAGAGCGGTGGTCCAGAATCACCATGAAGTGGTGAATTCATGGACGTGATCAGCGTAGCTACTGCCA
hVEGF165	81	TCCAATCGAGACCCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAGGCCATCCTGTGTGCCCC
Codon-opt.	81	TCCGATTGAACCCCTGGTGGACATTTTCCAGGAAATATCCGGACGAGATTGAGTACATCTTTAAGCCGTATGCGTTCCTG
hVEGF165	161	TGATGCGATGCGGSSGCTGCTGCAATGACGAGGSCCTGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGTCCAAACATCACCATGCGAGATT
Codon-opt.	161	TAAATGGCTGTGGTGGCTGTGCAACGATGAAAGGCTGGAAATGTGTACCCACTGAGAGAGCAACATCACCATGCGAGATT
hVEGF165	241	ATGCGGATCAAACTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTACAGCACAAACAATGTAATGCAGACCAAA
Codon-opt.	241	ATGGCATCAAAACCGCATCAAGGCCAGCATATTGGGAGATGTCCTTTCTGAGCACAAACAATGCGAATGCGCCCTAA
hVEGF165	321	GAAAGATAGAGCAAGAAATCCCTGTGGGCTTGCTCAGAGCGGAGARAGCATTGTTTTGACAAGATCCGCAGA
Codon-opt.	321	GAAAGATCGTGACCTCAAGAGAATCCCTGTGGACCATGCTCTGAAACCCGCAACAACCTGTTTGTCCAAAGATCCCAAA
hVEGF165	401	CGTGTAATGTTCTGCAAAAACACAGACTCGCGTGGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGACGTACTTGCAGATGT
Codon-opt.	401	CGTGTAATGCTCTGCAAGAATACCGATAGTCCGTGCAAAAGCCCTCAGCTGGAACGAAACGACGCACATGTGCTGTC
hVEGF165	481	GACAAAGCCGAGCCGTTGA
Codon-opt.	481	GATAAACCTCGTCGCTAA

**Abbildung 3.2:** Sequenzalignment der natürlichen und der Codon-optimierten Gensequenzen des VEGF<sub>165</sub>. Übereinstimmende Basen sind orange markiert, die Positionen, an denen Basenaustausche vorgenommen wurden, sind unmarkiert.

Dem Codon-optimierten VEGF-Gen wurde am 5'-Terminus des codierenden Stranges eine Basensequenz angehängt, die für einen proteolytisch abspaltbaren His-Tag codiert. Zusätzlich wurden am 5'-Terminus eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym NcoI und am 3'-Terminus eine Restriktionsschnittstelle für XhoI eingebracht, die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters die Klonierung des Gens in einen Expressionsvektor ermöglichten. Die komplette Gensequenz des Inserts ist in Anhang C.1 dargestellt. Das entsprechende Polynukleotid wurde nach Abschluss der theoretischen Konstruktion per Festphasensynthese von der Firma MWG-Biotech hergestellt.

### 3.1.2 Konstruktion des Expressionsvektors

Zum Einbringen des VEGF-Gens in den *E. coli* Expressionsstamm wurde der pET16b-Expressionsvektor der Firma Merck verwendet. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen und eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS), die stromabwärts des T7-Promotors liegt, der ursprünglich aus dem Bakteriophagen T7 stammt.

Der T7-Promotor wird spezifisch von der T7-RNA-Polymerase, nicht aber von der bakteriellen RNA-Polymerase, gebunden. Das eingebrachte VEGF-Gen wird daher nur von Bakterienstämmen translatiert, die die T7-RNA-Polymerase exprimieren, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3). Da der T7-Promotor des Plasmids zusätzlich unter der Kontrolle des

lac-Operators liegt, der vom konstitutiv exprimierten Lac-Repressorprotein blockiert wird, wird die rekombinante Proteinexpression unter normalen Kultivierungsbedingungen unterdrückt. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Expression des rekombinanten Proteins gezielt induziert werden, da das IPTG an das lac-Repressorprotein bindet und dadurch dessen Blockierung der Operatorregion verhindert. Die Translation des VEGF-Gens kann somit stattfinden [145].

Die induzierbare Proteinexpression ermöglicht große Ausbeuten in der rekombinanten Proteinproduktion, da die *E. coli* Kultivierung in eine Wachstumsphase und eine Produktionsphase geteilt werden kann. Während der Wachstumsphase wird zunächst Biomasse produziert, bevor die Proteinproduktion induziert wird. Da der T7-Promotor ein sehr starker Promotor ist, transkribieren die Bakterien nach der Induktion fast ausschließlich das in den pET-Vektor eingebrachte VEGF-Gen und produzieren das von diesem Gen codierte Protein.

Das VEGF-Gen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma MWG-Biotech wie in Abbildung 3.3 dargestellt mit Hilfe der Restriktionsenzyme NcoI und XhoI gerichtet in den Vektor kloniert, so dass das VEGF-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors steht. Die korrekte Basenabfolge des Inserts wurde im Anschluss an die Klonierung per Sequenzierung bestätigt.

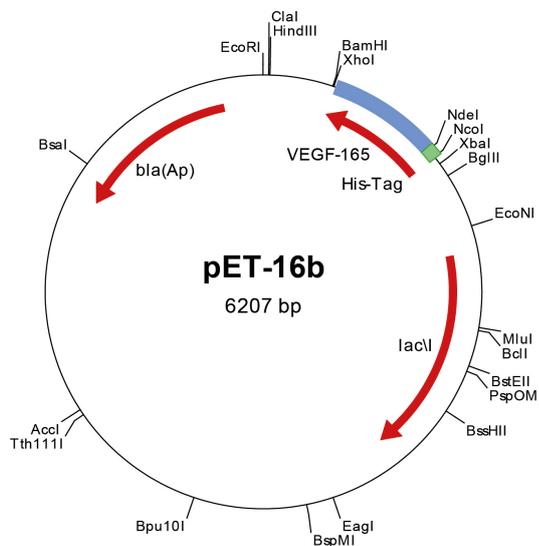
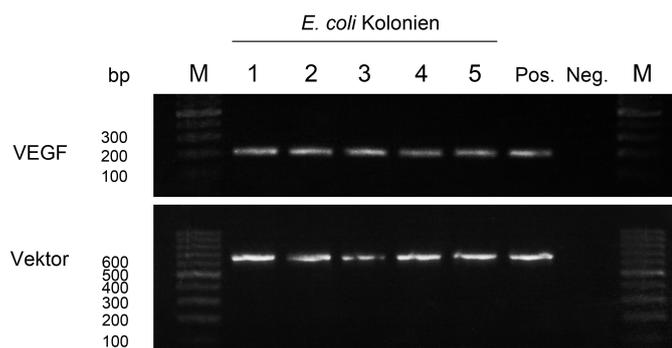


Abbildung 3.3: Expressionsvektor zur Produktion des VEGF-His-Fusionsproteins.

### 3.1.3 Transformation

Der pET16b-Vektor mit VEGF-Insert (pET16b-VEGF-His) wurde in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase „ $\lambda$ DE3“ in sein Genom integriert hat. Das „ $\lambda$ DE3“-Gen steht dabei genau wie das in den pET-Vektor eingebrachte VEGF-Gen unter

Kontrolle des lac-Operators und wird erst nach Zugabe von IPTG translatiert. Durch diese doppelte Expressionskontrolle wird die Basalexpression des rekombinanten Gens minimiert. Der Vektor pET16b-VEGF-His wurde per Hitzeschocktransformation in chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Es wurden insgesamt fünf Einzelkolonien gepickt und per Kolonie-PCR mit VEGF- und Vektor-spezifischen Primern amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate per Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden angefärbt. Abbildung 3.4 zeigt die DNA-Banden der VEGF- und Vektor-Amplifikate. In allen fünf Proben konnte ein eindeutiges VEGF-Amplifikat bei ca. 200 Basenpaaren (bp) und ein Vektoramplifikat bei ca. 700 bp nachgewiesen werden. Die Positionen der Banden stimmen mit denen der Positivkontrolle, bei der der isolierte Vektor pET16b-VEGF-His als Template eingesetzt wurde, überein und entsprechen der erwarteten Sequenzlängen (VEGF 202 bp, Vektor 692 bp). Als Negativkontrolle wurden untransformierte *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt. Hier konnte weder der Vektor noch das VEGF nachgewiesen werden. Mit den Kolonien 1 und 2 wurde jeweils eine Flüssigkultur angeimpft, aus der dann mehrere Gefrierkulturen angelegt wurden.



**Abbildung 3.4:** Nachweis der erfolgreichen Hitzeschocktransformation per Kolonie-PCR.

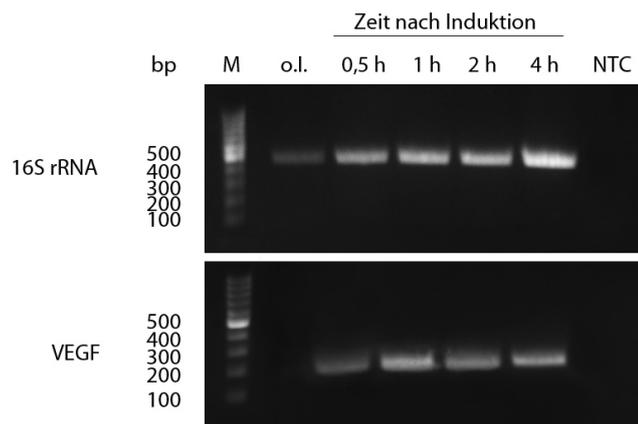
Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M) und die Amplifikate der gepickten Kolonien 1-5, des aufgereinigten Vektors (Pos) sowie des untransformierten *E. coli* BL21(DE3) (Neg) jeweils mit VEGF- und Vektor-spezifischen Primern.

## 3.2 Kultivierung und Proteinexpression

Die *E. coli* Kultivierungen zur VEGF-Produktion wurden im Schüttelkolben bei 37 °C und 170 rpm durchgeführt. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600}$ ) von ca. 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und es wurde für mehrere Stunden weiterkultiviert. Zum Nachweis der Expression des eingebrachten VEGF-Gens wurde vor der Induktion sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion 2 mL Bakteriensuspension entnommen und die Zellen wurden per Zentrifugation geerntet. Anschließend wurde aus jedem Zell-

pellet die RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Es wurde eine PCR mit VEGF-spezifischen Primern durchgeführt, um die Anwesenheit von VEGF-mRNA zu untersuchen. Zur Kontrolle wurde aus jeder Probe zusätzlich die bakterielle 16S-rRNA amplifiziert. Die DNA-Banden nach der Gelelektrophorese sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Das Gel zeigt in den nicht-induzierten Zellen keine VEGF-Bande, nach Zugabe von IPTG ist dagegen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine deutliche VEGF-Bande sichtbar. Dies weist auf eine nicht nachweisbare Basalexpression des VEGF und eine erfolgreiche Induktion der Proteinexpression hin. Anhand der Bandenstärke ist erkennbar, dass die Proteinexpression über mehrere Stunden konstant aktiv ist. Die stärkste Expression wird dabei nach 1 h erreicht. Im Gegensatz zum VEGF wird die 16S-rRNA konstitutiv und somit auch vor IPTG-Zugabe exprimiert. Die 16S-rRNA ist als Bestandteil der bakteriellen Ribosomen direkt an der Proteinbiosynthese beteiligt. Um die Überexpression des VEGF nach IPTG-Induktion zu gewährleisten, wird auch sie in größerem Maße exprimiert, was anhand der zunehmenden Bandenstärke deutlich wird.



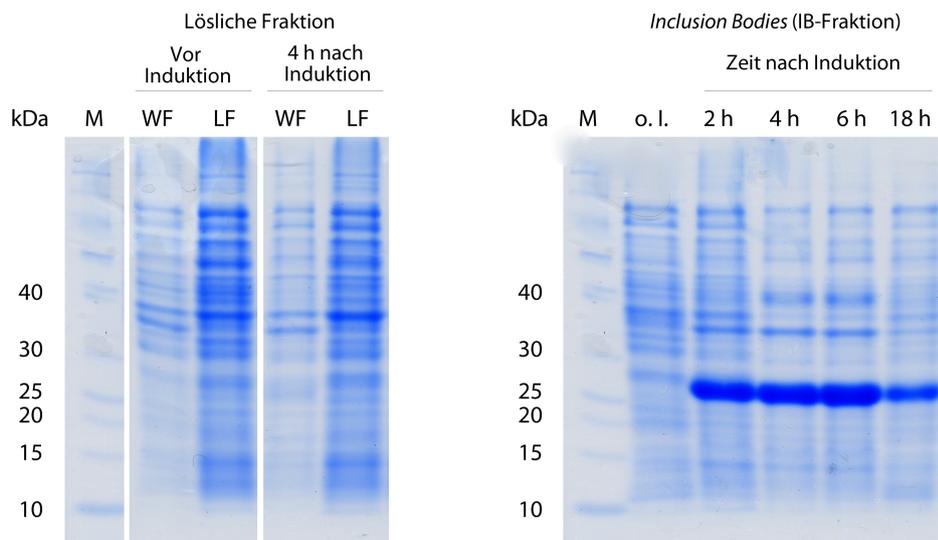
**Abbildung 3.5:** Nachweis der Expression des rekombinanten VEGF-Gens in *E. coli* per PCR.

Aufgetragen wurden jeweils die Amplifikate der PCR mit VEGF- und 16srRNA-spezifischen Primern vor Induktion der Proteinexpression (o. l.) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit IPTG. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Template-DNA (*Non template control*, NTC) aufgetragen.

Rekombinant exprimierte Proteine werden in *E. coli* häufig nicht korrekt oder nur unvollständig gefaltet, wodurch sie ausfallen und unlösliche Proteinaggregate, so genannte Einschlusskörperchen oder *Inclusion Bodies (IB)*, bilden. Dieses Phänomen tritt besonders häufig bei der hohen Proteinsyntheserate während einer rekombinanten Überexpression auf. Daher wurde zunächst untersucht, ob das rekombinant exprimierte VEGF sich in der löslichen Fraktion des Zellysats oder in der unlöslichen Fraktion befindet. Zur Untersuchung der unlöslichen Fraktion muss diese abgetrennt und mit einem denaturierenden Puffer in Lösung gebracht werden. Dabei wird das Protein durch die harschen Pufferbedingungen insbesondere durch die Pufferbestandteile Harnstoff und Dithiothreitol (DTT) ent-

faltet und die Löslichkeit so erhöht. Harnstoff ist eine chaotrope Verbindung, die Wasserstoffbrückenbindungen stört und damit die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins verhindert. DTT ist ein Reduktionsmittel, das die Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein-Seitenketten zerstört und ihre Neubildung verhindert. Hierdurch werden sowohl intramolekulare Faltungen als auch Oligomerisierungen mehrerer Peptide verhindert. Die Entfaltung der Proteine wird durch den basischen pH-Wert des Puffers unterstützt und die Löslichkeit des Proteins durch Zugabe einzelner Aminosäuren erhöht.

Die plasmidhaltigen *E. coli* wurden wie oben beschrieben kultiviert und zum einen vor der Induktion der Proteinexpression mit IPTG und zum anderen mehrere Stunden nach der Induktion geerntet. Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion jeweils per Zentrifugation abgetrennt. Die unlöslichen Fraktionen wurden mit Puffer gewaschen und anschließend mit einem denaturierenden Puffer in Lösung gebracht. Alle Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Abbildung 3.6 zeigt die Gele nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.



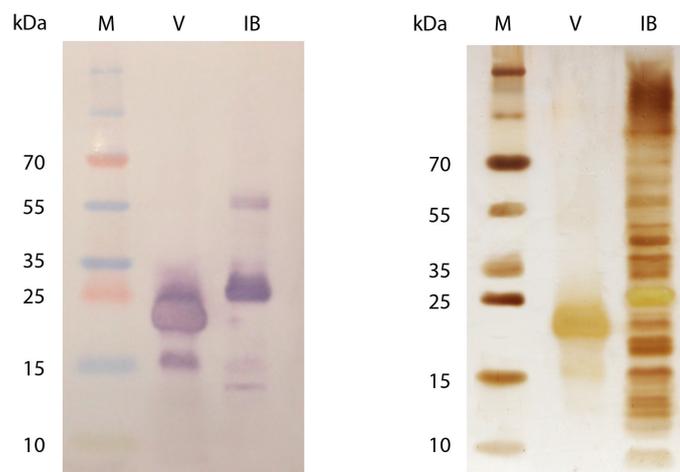
**Abbildung 3.6:** Nachweis des rekombinant in *E. coli* exprimierten VEGF im Zellysat (Lösliche Fraktion, LF) und in unlöslichen Einschlusskörpern (*Inclusion Bodies*, IB).

Aufgetragen wurden links die lösliche Fraktion (LF) und die Waschfraktion (WF) zur Aufarbeitung der *Inclusion Bodies* vor und nach der Induktion mit IPTG. Das Gel rechts zeigt die solubilisierte *Inclusion-Bodies*-Fraktion (IB) vor Induktion sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion.

Das Bandenmuster der löslichen Fraktion und der Waschfraktion vor der Induktion ist identisch mit dem Bandenmuster der jeweiligen Fraktion vier Stunden nach Induktion. Dagegen ist in der unlöslichen Fraktion nach IPTG-Zugabe die Überexpression eines Proteins bei ca. 25 kDa erkennbar. Dies entspricht etwa der erwarteten Größe des rekombinant exprimierten VEGF-His-Monomers, die bei 21,5 kDa liegt.

Um die Identität der Bande eindeutig zu klären, wurde die *Inclusion-Bodies*-Fraktion erneut per SDS-PAGE analysiert und das VEGF mittels Western Blot mit einem Anti-VEGF-Antikörper spezifisch nachgewiesen. Zum Vergleich wurde kommerzielles, rekombinant produziertes VEGF analysiert.

Abbildung 3.7 zeigt die gefärbte Western Blot Membran sowie das Proteingel nach Silberfärbung. In der unlöslichen Fraktion konnte das VEGF-Fusionsprotein eindeutig nachgewiesen werden. Das VEGF-His-Monomer wird durch eine starke Bande bei ca. 25 kDa repräsentiert. Darüber hinaus ist ebenfalls eine Bande bei ca. 55 kDa sichtbar, die durch das VEGF-Dimer entsteht und darauf hinweist, dass das Protein im Probenauftragspuffer nicht vollständig reduziert wurde. Die sehr schwachen Banden bei 13 und 15 kDa resultieren vermutlich aus nicht vollständig translatierten VEGF-Peptiden. Das zum Vergleich analysierte kommerzielle VEGF wurde in Insektenzellen produziert, die mit einem Baculovirus transfiziert wurden. Das kommerzielle Protein besteht aus den 165 Aminosäuren des reifen VEGF ohne zusätzlichen Protein-Tag. Hieraus resultiert ein theoretisches Molekulargewicht von 19,4 kDa pro Monomer. In der Western Blot Analyse wurden zwei Monomerbanden zwischen 15 und 25 kDa detektiert. Diese Heterogenität der VEGF-Monomere ist laut Herstellerangaben auf unterschiedliche Glycosylierungszustände zurückzuführen.



**Abbildung 3.7:** Nachweis des VEGF in der *Inclusion-Bodies*-Fraktion per Western Blot Analyse.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), kommerzielles VEGF (V) und die solubilisierte *Inclusion-Bodies*-Fraktion (IB).

### 3.3 Proteinaufreinigung

Während der Solubilisierung der *Inclusion Bodies* wurde das VEGF entfaltet und liegt in dieser Form im Proteinrohextrakt vor. Die Faltung des VEGF erfolgt durch Verdünnung und Pufferaustausch während des Aufreinigungsvorgangs, wobei es auch zu fehlerhaften Faltungen kommen kann [146]. Ziel

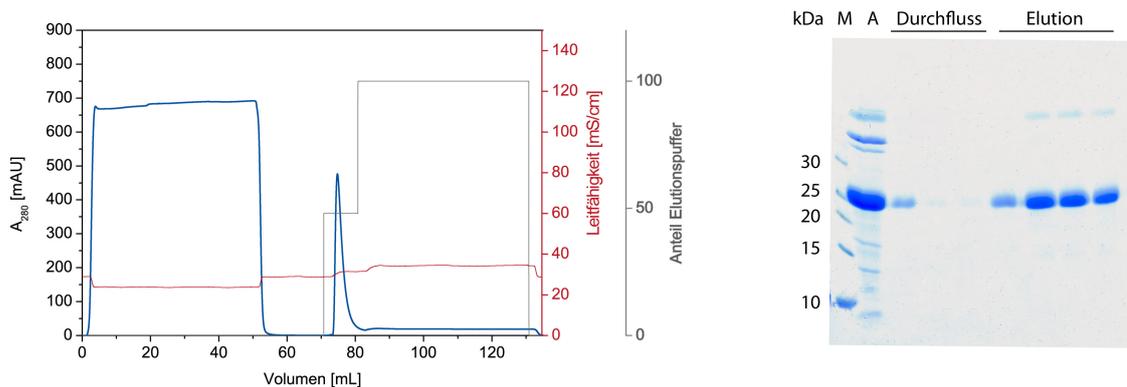
der Proteinaufreinigung ist es daher nicht nur, das VEGF aus dem Proteinrohextrakt zu isolieren, sondern auch das fehlgefaltete VEGF abzutrennen. Um dies zu gewährleisten, wurden zwei Chromatographieschritte durchgeführt. Zunächst wurde das VEGF über seinen Histidin-Affinitäts-Tag per Metallchelatchromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) aus dem Proteinrohextrakt isoliert. Die Chromatographiepuffer sind frei von DTT und Harnstoff, so dass sich während des Pufferaustauschs die typische Proteinstruktur ausbilden und sich das VEGF falten kann. Im Anschluss wurde eine Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der nur die VEGF-Moleküle mit korrekt gefalteter Heparinbindedomäne an die Affinitätssäule binden können. Das auf diese Weise aufgereinigte Fusionsprotein wurde für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche eingesetzt.

Falls für spezifische Anwendungen das VEGF in seiner nativen Sequenz ohne zusätzliche Aminosäuren benötigt wird, ist es möglich den Aufreinigungsvorgang um eine enzymatische Spaltung und einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt zu erweitern. Der Affinitäts-Tag kann durch enzymatische Spaltung mit dem Faktor Xa entfernt werden und in einem dritten Chromatographieschritt kann dann entweder per IMAC oder per Größenausschlusschromatographie das native VEGF aufgereinigt werden.

### Nickel-Chelatchromatographie

Im ersten Aufreinigungsschritt wurde der VEGF-haltige Proteinrohextrakt per Nickel-Chelatchromatographie aufgetrennt. Das Trennprinzip der Metallchelatchromatographie basiert auf der Affinität zweiwertiger Metallionen zu bestimmten Aminosäuren, besonders dem Histidin. Die Affinitätssäule besteht aus kovalent an das Säulenmaterial gebundenen mehrzähligen Liganden, die mit den zweiwertigen Metallionen einen Chelatkomplex bilden. Die freien Koordinationsstellen des Metalls können mit bestimmten funktionellen Gruppen an der Oberfläche eines Peptids oder Proteins, z. B. dem Imidazolring der Histidinseitenkette, in Wechselwirkung treten. Da das rekombinant produzierte VEGF einen Histidin-Affinitäts-Tag aus insgesamt acht Histidinresten trägt, ist seine Affinität zum Säulenmaterial höher als die der Fremdproteine, wodurch die Aufreinigung per IMAC ermöglicht wird.

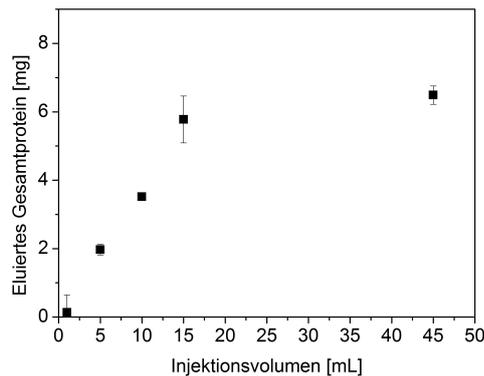
Zur Aufreinigung des VEGF wurde eine Affinitätssäule aus modifizierter Sepharose mit einem Bettvolumen von 1 mL verwendet, die mit Nickel-Ionen beladen war. Der Probenauftrag erfolgte in einem Phosphatpuffer mit 300 mM NaCl bei pH 8 und das gebundene Protein wurde mit einem optimierten Stufengradienten bei 240 mM Imidazol eluiert. Abbildung 3.8 zeigt das Chromatogramm der VEGF-Aufreinigung per IMAC sowie das entsprechende Gel der SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Fraktionen. Es verdeutlicht die erfolgreiche Affinitätsaufreinigung des VEGF, wobei in den Elutionsfraktionen jeweils eine Bande des VEGF-Monomers und des Dimers sichtbar wird. Die densitometrisch



**Abbildung 3.8:** Aufreinigung von VEGF-His-8 per Nickel-Chelatchromatographie.

Links ist das Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen. Aufgetragen wurden die aufzureinigende *Inclusion-Bodies*-Fraktion (A), die Fraktionen des Durchflusses und der Elution.

bestimmte Reinheit des VEGF beträgt nach der Aufreinigung 92,1 % im Vergleich zu 61,3 % im Rohextrakt.



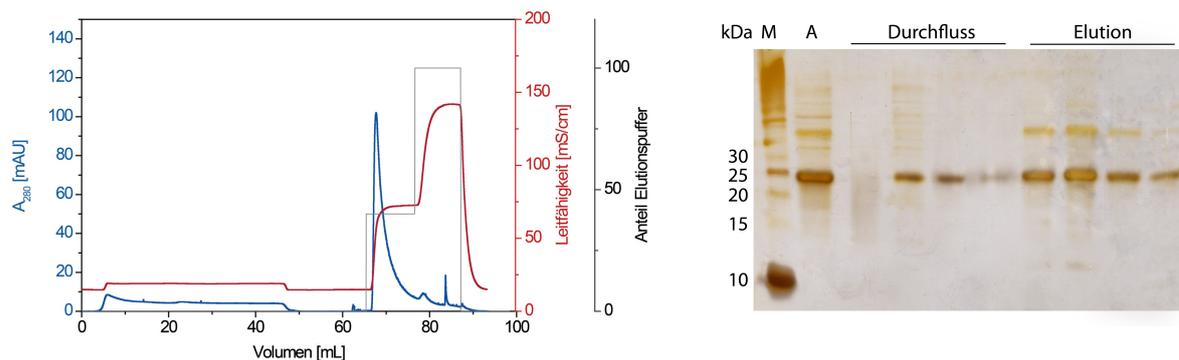
**Abbildung 3.9:** Bestimmung der maximalen VEGF-Bindekapazität der Nickel-Chelat-Säule.

Aufgetragen ist die Gesamtmenge des eluierten Proteins in Abhängigkeit zum Injektionsvolumen der aufzureinigende *Inclusion-Bodies*-Fraktion. Die maximale Bindekapazität der Säule lag bei 6,5 mg pro mL Säulenvolumen.

Zur Optimierung des Aufreinigungsprozesses wurde die maximale VEGF-Bindekapazität der Nickel-Chelat-Affinitätssäule bestimmt, indem der IMAC-Lauf mit unterschiedlichen Injektionsvolumina wiederholt wurde. Nach jedem Lauf wurde die Gesamtproteinmenge in den Elutionsfraktionen bestimmt und gegen das Injektionsvolumen aufgetragen (Abbildung 3.9). Die maximale Bindekapazität der Säule lag bei 6,5 mg pro mL Säulenmaterial.

### Heparin-Affinitätschromatographie

Im zweiten Aufreinigungsschritt wurden die vereinigten Elutionsfraktionen der IMAC per Heparin-Affinitätschromatographie aufgetrennt. Es wurde eine Affinitätssäule aus Heparin-modifizierter Sepharose mit einem Bettvolumen von 5 mL verwendet. Der Probenauftrag erfolgte in einem Phosphatpuffer (*Phosphate-buffered saline with Tween 20*, PBST, pH 8), die Elution mit einem optimierten Stufengradienten bei 650 mM NaCl. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

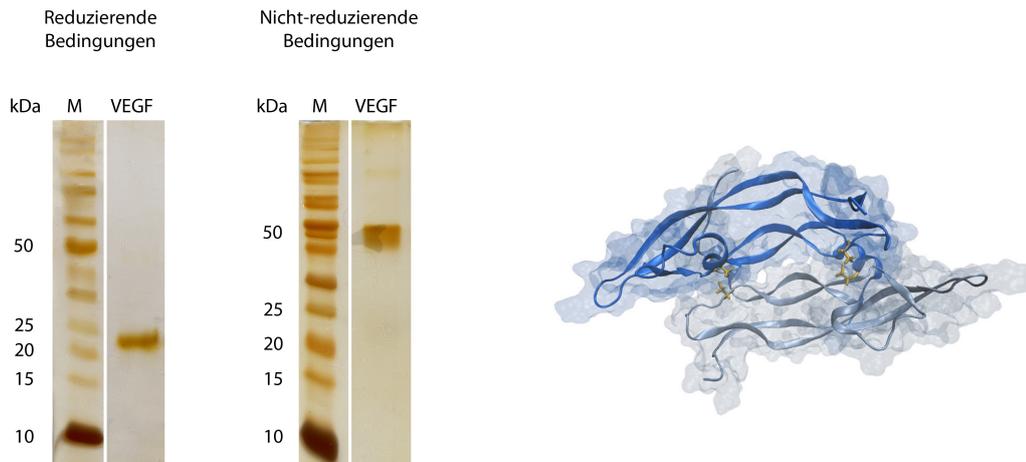


**Abbildung 3.10:** Aufreinigung von VEGF-His per Heparin-Affinitätschromatographie.

Links ist das Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen. Aufgetragen wurden das verdünnte Eluat der Ni-Chelatchromatographie (A), die Fraktionen des Durchflusses und der Elution.

Es zeigt, dass im vereinigten Eluat der IMAC noch einige Verunreinigungen vorhanden sind, die erst im silbergefärbten Proteingel sichtbar werden. Diese Verunreinigungen sowie vermutlich fehlgefaltetes VEGF finden sich im Durchfluss und konnten per Heparin-Affinitätschromatographie abgetrennt werden. Ein Großteil des VEGF wurde dagegen von der Affinitätssäule gebunden, was auf eine korrekte Proteinfaltung hinweist.

Für die biologische Aktivität des VEGF ist neben der korrekten Faltung der Heparinbindedomäne auch die Verknüpfung zweier VEGF-Peptide zum Homodimer notwendig. Um diese Dimerisierung des VEGF nachzuweisen, wurde das VEGF nach der Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen jeweils per SDS-PAGE analysiert. Die zugehörigen silbergefärbten Gele sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Während unter reduzierenden Bedingungen die VEGF-Bande zwischen 20 und 25 kDa sichtbar ist, was der Größe des VEGF-Monomers entspricht, liegt diese Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei ca. 50 kDa. Hier sind die beiden Disulfidbrücken, die die beiden VEGF-Ketten kovalent miteinander verknüpfen, ausgebildet, so dass das VEGF als Dimer vorliegt.



**Abbildung 3.11:** Nachweis der Dimerisierung des VEGF zum Homodimer per SDS-PAGE-Analyse.

Links: SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen zum Nachweis des VEGF-Monomers und unter nicht-reduzierenden Bedingungen zum Nachweis des VEGF-Dimers. Rechts: Kristallstruktur der dimeren Rezeptorbindedomäne des VEGF. Die verbrückenden Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt.

## Zusammenfassung

Durch die rekombinante Expression des VEGF in *E. coli* und die anschließende chromatographische Aufreinigung wurde VEGF im Milligrammmaßstab bereitgestellt. Wie Tabelle 3.1 zusammenfassend darstellt, wurden durch Solubilisierung der intrazellulären *Inclusion Bodies* 83,2 mg Proteinrohextrakt aus einem Liter Flüssigkultur gewonnen. Der Anteil des VEGF im Rohextrakt beträgt 61 % des Gesamtproteins, was ca. 51 mg VEGF entspricht. Davon konnten nach dem ersten Chromatographieschritt 79 % des VEGF eluiert werden. Durch Verluste während des Umpufferns in den Heparinbindepuffer und die Abtrennung des fehlgefalteten VEGF konnten nach der Heparin-Affinitätschromatographie 19,5 mg VEGF gewonnen werden, wobei das VEGF wie in seiner natürlichen Form als Homodimer vorliegt. Per Densitometrie wurde eine Reinheit von 93,2 % ermittelt, wobei ein Teil der „Verunreinigungen“ auf nicht reduzierte VEGF-Dimere zurückzuführen ist.

**Tabelle 3.1:** Proteinausbeute und -reinheit während der Aufreinigung des VEGF.

	Gesamtprotein [mg/L Flüssigkultur]	Reinheit*	VEGF-Gesamtmenge** [mg/L Flüssigkultur]	Ausbeute
Solubilierte <i>Inclusion Bodies</i>	83,2	61,3 %	51,0	100 %
Nach Ni-IMAC	43,9	92,1 %	40,4	79,3 %
Nach Heparin-Affinitätsaufreinigung	19,5	93,2 %	18,2	35,6 %

\*Die Reinheit wurde densitometrisch bestimmt.

\*\*Die VEGF-Gesamtmenge wurde aus der Reinheit und dem Gesamtprotein berechnet.

## 3.4 Proteincharakterisierung

### 3.4.1 Biochemische Eigenschaften

Das rekombinant produzierte VEGF unterscheidet sich durch seinen N-terminalen His-Tag und die fehlende Glycosylierung vom natürlich vorkommenden humanen VEGF<sub>165</sub>. Daher ist es möglich, dass die biochemischen Eigenschaften wie z. B. der isoelektrische Punkt abweichen, was Einfluss auf die späteren Analysen haben könnte. Es wurden einige physikochemische Eigenschaften der Proteinsequenzen mit Hilfe des ExPasy ProtParam-Tools [147] vorhergesagt. In Tabelle 3.2 sind diese Eigenschaften für das selbst hergestellte und das natürliche VEGF im Vergleich dargestellt. Zusätzlich sind der isoelektrische Punkt und die Hydrophobizität für die Heparinbindedomäne und die Rezeptorbindedomäne des VEGF aufgeschlüsselt. Es fällt auf, dass die beiden VEGF-Typen sich kaum in ihren Proteineigenschaften unterscheiden. Lediglich die erwartete *in vivo* Halbwertszeit wurde durch Anhängen des N-terminalen His-Tags deutlich erhöht, was die biologische Aktivität positiv beeinflussen könnte.

**Tabelle 3.2:** Proteineigenschaften des nativen und rekombinant exprimierten VEGF.

	VEGF	VEGF-His	Heparinbindedomäne A131...R185	Rezeptorbindedomäne E33...R130
Molekulargewicht, Monomer unmod.	19,2 kDa	21,5 kDa		
Molekulargewicht, Dimer (unglyc.)	-	43,0 kDa		
Molekulargewicht, Dimer (glyc.)	47,0 kDa	-		
Isoelektrischer Punkt	7,60	7,58	9,27	5,29
<i>In vivo</i> Halbwertszeit in tierischen Zellen	4,4 h	30 h		
Durchschnittliche Hydrophobizität	-0,9	-0,989	-1,482	-0,539

Innerhalb des VEGF-Moleküls ist hingegen deutlich ein unterschiedlicher Charakter der Heparin- und Rezeptorbindedomäne erkennbar. So liegt der isoelektrische Punkt (pI) der Heparinbindedomäne im basischen Milieu im Gegensatz zum sauren pI der Rezeptorbindedomäne. Die durchschnittliche Hydrophobizität klassifiziert das VEGF als schwach hydrophiles Protein, wobei die Heparinbindedomäne einen hydrophileren Charakter aufweist als die Rezeptorbindedomäne. Die durchschnittliche Hydrophobizität beschreibt dabei den Mittelwert der nach Kyte und Doolittle bestimmten Hydrophobizitätswerte aller Aminosäuren, wobei das Isoleucin als meist hydrophobe Aminosäure einen Wert von 4,5 einnimmt und das Arginin als hydrophilste Aminosäure den Wert -4,5 [148].

Sowohl die Hydrophobizität als auch die mit dem isoelektrischen Punkt verbundene Nettoladung der Proteindomäne sind möglicherweise für die VEGF-Aptamer-Bindung von Bedeutung. Sie begünstigen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen. Die meisten der in Tabelle 2.3 zusammen-

gefassten bekannten VEGF-bindenden Aptamere sind gegen die Heparinbindedomäne des Proteins gerichtet, wobei das einzige Aptamer, das bekanntermaßen an die Rezeptorbindedomäne gerichtet ist, unter Verwendung der VEGF-Isoform 121 selektiert wurde, die keine Heparinbindedomäne besitzt. Dies deutet, genau wie die aufgezeigten Proteineigenschaften darauf hin, dass die Heparinbindedomäne sich besonders für eine Aptamer-Protein-Bindung eignet.

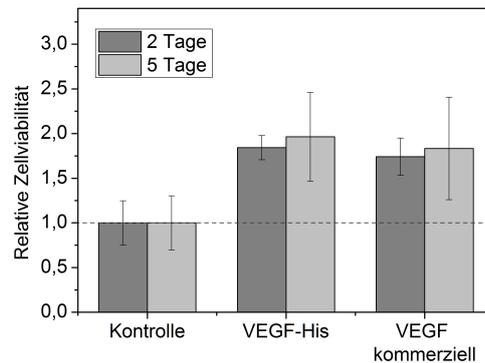
### 3.4.2 Biologische Aktivität

Die biologische *in vivo* Aktivität des VEGF beruht auf seiner Fähigkeit, das Wachstum verschiedener Endothelzellen aus Arterien, Venen und Lymphgefäßen zu stimulieren und so die Neubildung (Vaskulogenese) und das Wachstum (Angiogenese) der Blutgefäße zu induzieren [149]. Das VEGF wirkt dabei als Cytokin und bindet an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird. Für die erfolgreiche Cytokin-Rezeptor-Bindung ist die korrekte dreidimensionale Faltung des VEGF eine Grundvoraussetzung.

Da das VEGF *in vitro* die Proliferation und die Migration endothelialer Zellen stimuliert [150], kann die biologische Aktivität mittels Zellkultur-basierter Assays nachgewiesen werden. Mittels eines solchen Aktivitätstests wurde das rekombinant produzierte VEGF analysiert, um Rückschlüsse auf die Proteinkonformation zu ziehen. Da es im Vergleich zum natürlich vorkommenden humanen VEGF einen His-Tag trägt und es nicht glycosyliert ist, sollte insbesondere geklärt werden, ob die strukturellen Unterschiede die biologische Aktivität beeinflussen.

Für den Aktivitätstest wurden humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) eingesetzt, die sich aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit als Standardtestsystem zur Bestimmung der VEGF-Bioaktivität etabliert haben. Als Medium wurde das Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM-2) der Firma Promocell gewählt, da es die Kultivierung bei geringen Serumkonzentrationen ermöglicht und alle weiteren Supplemente des Mediums einzeln zugegeben werden können. Für den Aktivitätstest wurde das EGM-2 Basalmedium mit 0,2 % Fetalem Kälber Serum (FCS) supplementiert und als Kontrollmedium eingesetzt. Zur Bestimmung der VEGF-Bioaktivität wurde das Kontrollmedium zum einen mit selbst hergestelltem zum anderen mit kommerziell verfügbarem VEGF jeweils in einer Endkonzentration von 20 ng/mL versetzt. Die HUVEC wurden im jeweiligen Medium für zwei oder fünf Tage kultiviert, anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue (CTB) Assay bestimmt. Abbildung 3.12 zeigt die relative Zellviabilität in den unterschiedlich supplementierten Medien nach zwei- und fünftägiger Kultivierung.

Da in der Vergangenheit bereits gezeigt wurde, dass das VEGF die Proliferation von Endothelzellen in geringerem Maße stimuliert als andere Wachstumsfaktoren [151, 152], war für die ausschließliche Supplementierung mit VEGF ein geringerer Effekt zu erwarten. Die Zellviabilität im VEGF-haltigen Medium war sowohl nach 2 als auch nach 5 Tagen etwa doppelt hoch wie im Kontrollmedium. Die



**Abbildung 3.12:** Nachweis der biologischen Aktivität des VEGF-His-Fusionsproteins im Vergleich zu kommerziell erhältlichem VEGF per CTB-Zellviabilitätstest.

Untersucht wurde die proliferationsfördernde Aktivität des rekombinant in *E. coli* produzierten VEGF-His-Fusionsproteins (VEGF-His) in einer Endkonzentration von 20 ng/mL im Vergleich zu kommerziellem VEGF (#CYT-26982, Dianova) in gleicher Konzentration. Das Kontrollmedium enthielt 0,2 % FCS ohne weitere Supplemente.

proliferationsfördernde Aktivität des in *E. coli* produzierten VEGF war dabei vergleichbar mit der des kommerziell erhältlichen VEGF, das rekombinant in Insektenzellen produziert wurde. Die biologische Aktivität des selbst hergestellten VEGF konnte somit nachgewiesen werden und scheint durch die strukturellen Unterschiede zum natürlichen VEGF nicht beeinflusst zu werden.

## 4 Bereitstellung VEGF-bindender Aptamere

### 4.1 Auswahl der Aptamere

Zur Entwicklung Aptamer-basierter Methoden zur Aufreinigung und zur Detektion des VEGF wurde auf bereits selektierte Aptamere zurückgegriffen. Aus der Vielzahl der publizierten Aptamersequenzen, die in Abschnitt 2.4.2 vorgestellt wurden, wurden zunächst alle DNA-Aptamere ausgewählt, da sie eine höhere chemische Stabilität als RNA-Oligonukleotide aufweisen. Dies ist besonders zur Detektion des VEGF in Zelllysaten oder zur Aufreinigung des Proteins entscheidend, da im Zelllysat eine Vielzahl von Nukleasen vorhanden sind, denen die Aptamere ausgesetzt sind. Aus den zur Verfügung stehenden vier DNA-Aptamerfamilien (zum Auswahlzeitpunkt waren die von Yoshida *et al.*, Jing *et al.* Kimoto *et al.* und Meng *et al.* selektierten Aptamere noch nicht publiziert), wurde jeweils die Aptamersequenz mit der höchsten Bindeaffinität zum VEGF ausgewählt. Sie sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Während die Aptamere V7t1, Del5-1 und 33t5 aus unterschiedlichen Selektionsprozessen stammen, handelt es sich beim SL2B um eine verkürzte Form des Aptamers Del5-1.

Tabelle 4.1: Ausgewählte VEGF-bindende DNA-Aptamere.

Aptamer	Sequenz	*K <sub>D</sub>	Spezifität	Quelle
33t5	CCC GTC TTC CAG ACA AGA GTG CAG GG	10,9 nM	unbekannt	[111, 112]
V7t1	TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG A	1,4 nM	RBD	[120]
Del5-1	ATA CCA GTC TAT TCA ATT GGG CCC GTC CGT ATG GTG GGT GTG CTG GCC AG	20,7 nM	HBD	[118]
SL2B	CAA TTG GGC CCG TCC GTA TGG TGG GT	0,5 nM	HBD	[119]

\* K<sub>D</sub>-Wert laut Literaturangabe

Die ausgewählten Aptamere bestehen aus 25 bis 50 Nukleotiden und unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen in ihrer Faltungsstruktur. Als Kontroll-Oligonukleotide wurden das 63-nt Aptamer 266, das gegen das Fc-Fragment eines Antikörpers gerichtet ist, sowie eine Zufalls-DNA-Sequenz aus 47 Nukleotiden eingesetzt. Die Längen der beiden Kontrollsequenzen entsprechen damit etwa der Länge des längsten VEGF-bindenden Aptamers Del5-1. Alle Aptamere binden das VEGF mit Dissoziationskonstanten (K<sub>D</sub>-Werte) im niedrigen nanomolaren Bereich. Es ist zu berücksichtigen, dass die Dissoziationskonstanten wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben mit Hilfe unterschiedlicher Methoden ermittelt wurden und somit nicht direkt vergleichbar sind. Je nach Messmethode wurde

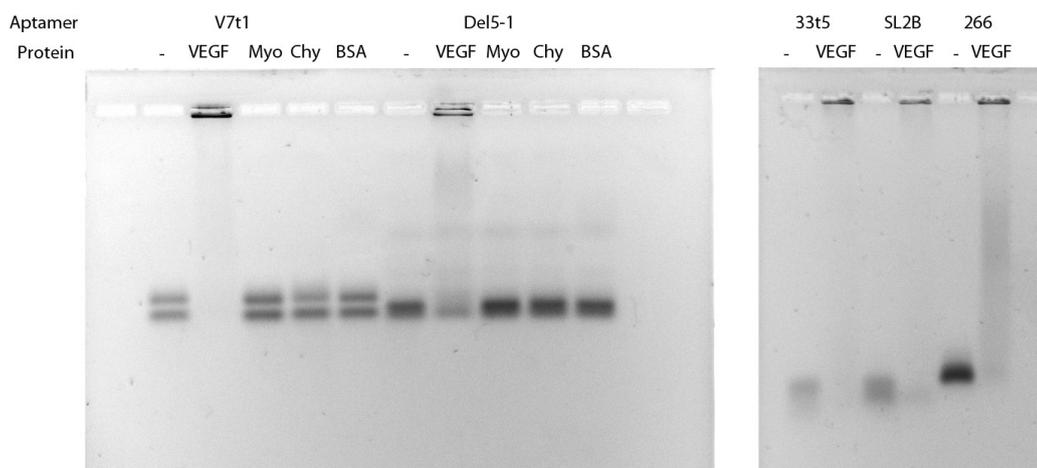
die Bindeaffinität entweder in Lösung oder mit einem immobilisierten Bindungspartner bestimmt, was die Interaktion zwischen Protein und Aptamer beeinflussen kann.

Die Aptamere V7t1 und Del5-1/SL2B wurden in TRIS-gepufferter Salzlösung mit EDTA (*TRISbuffered saline with EDTA*, TBSE) selektiert, das 33t5 in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Für das 33t5 wurde jedoch festgestellt, dass sich TRIS-basierte Puffer positiv auf die Bindeaffinität auswirken [111] und divalente Ionen wie beispielsweise  $Mg^{2+}$  Aptamerkonformationen stabilisieren, die nicht in der Lage sind, VEGF zu binden [113]. TBSE enthält keine zweiwertigen Ionen und das EDTA kann als Chelator mögliche eingebrachte zweiwertige Ionen abfangen, so dass sich der Puffer auch für das Aptamer 33t5 als Aptamerbindepuffer eignet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden daher unabhängig vom eingesetzten Aptamer mit TBSE (teilweise mit Zusatz von 0,05 % Tween 20, bezeichnet als TBSET) als Aptamerbindepuffer durchgeführt.

## 4.2 Nachweis der Aptamer-Protein-Bindung in Lösung

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde die Bindung der ausgewählten Aptamere an das rekombinant hergestellte VEGF per *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) analysiert. Hierzu wurden die mit dem Fluorophor Cyanin 3 (Cy3) markierten Aptamere im entsprechenden Bindepuffer mit VEGF im Überschuss inkubiert und anschließend per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die freien Aptamere sind zwischen 7,9 und 15,4 kDa groß und somit in der Lage, die Poren des Gels zu penetrieren, während die Aptamer-Protein-Komplexe aufgrund ihrer Größe und ihrer Ladung das Gel nur sehr langsam durchwandern. Per UV-Licht wurden die markierten Aptamere visualisiert, während reine Proteinbanden unsichtbar blieben. Die Ergebnisse des EMSA sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Gelbilder zeigen für alle vier eingesetzten VEGF-Aptamere eine deutliche Aptamerbande im unteren Gelbereich. Das Aptamer V7t1 bildet eine Doppelbande, die möglicherweise aus den unterschiedlichen Faltungsstrukturen resultiert. Nach Inkubation mit VEGF liegen die Banden in unmittelbarer Nähe zur Beladungstasche des Gels und weisen somit die erfolgreiche Bindung an VEGF nach. Die Proben der Aptamere Del5-1 und SL2B zeigen nach Inkubation mit VEGF zwei Banden: Eine liegt in der Nähe der Beladungstasche und eine auf Höhe des ungebundenen Aptamers, was auf eine nicht vollständige Bindung an VEGF und möglicherweise eine unter den Versuchsbedingungen geringere Bindeaffinität hinweist.

Zur Bestimmung der Spezifität der Aptamer-VEGF-Bindung wurden die Aptamere mit drei Kontrollproteinen inkubiert, die unterschiedliche isoelektrische Punkte und somit unterschiedliche Nettoladungen aufweisen: Es wurden die Proteine BSA (pI 4,7), Myoglobin (pI 6,8/7,2) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (pI 8,8) eingesetzt. Hierdurch sollten insbesondere elektrostatische Wechselwirkungen zum negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat des Aptamers untersucht werden, die schon in anderen Arbeiten als kritische Faktoren für die Bindespezifität identifiziert wurden [153]. Wie in Abbildung 4.1 für



**Abbildung 4.1:** Nachweis der Aptamer-Protein-Bindung per EMSA.

Aufgetragen wurden links: die Aptamere V7t1 und Del5-1 (Endkonzentration je  $2\ \mu\text{M}$ ) jeweils ohne Proteinzugabe (-) und in Kombination mit VEGF, Myoglobin (Myo),  $\alpha$ -Chymotrypsin (Chy) und BSA (Proteinkonzentration je  $14,25\ \mu\text{M}$ ). Rechts wurden die Aptamere 33t5, SL2B und 266 (je  $2\ \mu\text{M}$ ) jeweils ohne Proteinzugabe (-) und in Kombination mit VEGF ( $14,25\ \mu\text{M}$ ) aufgetragen.

die Aptamere V7t1 und Del5-1 beispielhaft gezeigt, war keine unspezifische Bindung an BSA, Myoglobin und  $\alpha$ -Chymotrypsin zu beobachten. Zusätzlich wurde das VEGF mit dem Aptamer 266 inkubiert, das nicht gegen VEGF sondern das  $F_c$ -Fragment eines humanen Antikörpers gerichtet ist. Auch dieses Oligonukleotid war in der Lage, das VEGF zu binden. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Kanakaraja *et al.* [117], dass das Aptamer das VEGF selektiv bindet, im Gegensatz zu verschiedenen Kontrollproteinen. Ebenfalls wird jedoch deutlich, dass das VEGF nicht ausschließlich sequenzspezifisch gebunden wird. Möglicherweise ist die Heparinbindedomäne des VEGF nicht nur in der Lage, Wechselwirkungen mit dem Zuckerpolymer Heparin sondern auch mit dem Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA einzugehen, während die Interaktion mit einzelnen Basen eine untergeordnete Rolle spielen.

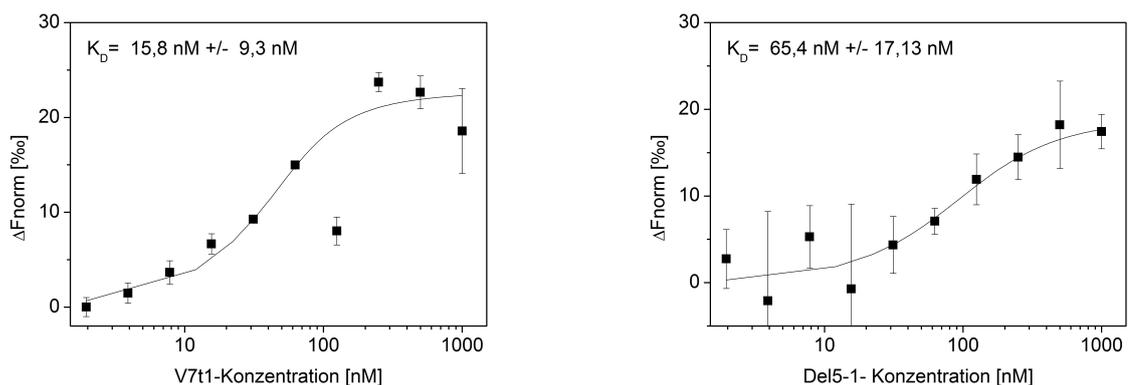
### 4.3 Bestimmung von Affinitäten in Lösung

Anhand der beiden Beispielaaptamere V7t1 und Del5-1 werden im Folgenden die Bindeaffinitäten der Aptamere zum VEGF in Lösung bestimmt. Dabei sollen zum einen die Bindeaffinitäten der beiden Aptamere verglichen werden, zum anderen soll der Einfluss von Aptamermodifikationen, wie zum Beispiel die Konjugation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 untersucht werden. Darüber hinaus werden mögliche Aviditätseffekte, eine multivalente Bindung zum VEGF durch Einsatz mehrerer miteinander verbundener Aptamere analysiert.

Alle Bindeaffinitäten in Lösung wurden thermophoretisch per MST (*Microscale Thermophoresis*) be-

stimmt. Die MST beruht auf einem als Thermophorese bezeichneten physikalischen Effekt in Fluiden, der die Bewegung von Molekülen innerhalb eines Temperaturgradienten beschreibt. Die Bewegung ist von den Moleküleigenschaften wie Größe, Ladung und Hydrophobizität abhängig und ändert sich somit durch Bindung eines Liganden. Die Thermophorese kann mit Hilfe eines Lasers durch punktuell Erhitzen des Fluids in einer Kapillare induziert werden, und die thermophoretische Bewegung eines fluoreszenzmarkierten Moleküls kann durch zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals gemessen werden [154]. Durch Titrationsexperimente ist es möglich, die Änderung der thermophoretischen Bewegung mit steigender Ligand-Rezeptor-Interaktion zu messen und diese in einer Bindungskurve darzustellen.

Die Bindungskurven der Interaktion der unmodifizierten Aptamere V7t1 und Del5-1 mit fluoreszenzmarkiertem VEGF sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Sie bestätigen die per EMSA nachgewiesene Aptamer-Protein-Bindung und weisen auf eine hohe Affinität beider Aptamere zum VEGF hin. Durch nicht-lineare Kurvenanpassung nach dem Massenwirkungsgesetz wurde für die V7t1-VEGF-Bindung ein  $K_D$ -Wert von 15,8 nM und für die Del5-1-VEGF-Bindung ein  $K_D$ -Wert von 65,4 nM ermittelt.



**Abbildung 4.2:** Bindungskurven der VEGF-V7t1 und VEGF-Del5-1 Bindung.

Dargestellt ist die Änderung des normierten Fluoreszenzsignals  $\Delta F_{\text{norm}}$  während der Thermophorese in Abhängigkeit der Aptamer-Konzentration.

### 4.3.1 Einfluss von Aptamermodifikationen auf die Affinität

Modifikationen des Aptamers wie Konjugation mit Fluorophoren oder die Immobilisierung auf einer festen Oberfläche sind für den Einsatz der Aptamere in Microarray-Experimenten oder zur Proteinaufreinigung notwendig, bergen jedoch die Gefahr, die Aptamerfaltung und somit die Targetbindung zu stören. Anhand des Aptamers V7t1 wurde daher der Einfluss der Aptamermodifikation auf die VEGF-Bindeaffinität untersucht. Zum einen wurde Cy3-modifiziertes V7t1 eingesetzt zum anderen wurden Quantum-Dot-gekoppelte Aptamere untersucht. Cy3 ist ein organisches Fluorophor und mit einem Molekulargewicht von 0,77 kDa gegenüber dem V7t1 mit einem Molekulargewicht von 7,9 kDa

ein vergleichsweise kleines Molekül. Es ist terminal in einer 1:1-Stöchiometrie kovalent an das V7t1 gebunden. Ein Quantum Dot ist dagegen eine anorganische Nanokristallstruktur, die etwa die Größe eines großen Makromoleküls wie z. B. eines Proteins besitzt. Über eine terminale Aminomodifizierung können mehrere V7t1-Aptamere an einen Quantum Dot gekoppelt werden.

### Konjugation mit Cyanin 3

Zunächst wurde zur Bestimmung der Bindeaffinität des Cy3-gekoppelten Aptamers V7t1 zum VEGF eine Bindungskurve aufgenommen, die in Abbildung 4.3 dargestellt ist. Der ermittelte  $K_D$ -Wert von 63,7 nM ist zwar um das 4,5-fache größer als der des unmodifizierten V7t1, liegt jedoch weiterhin im niedrigen nanomolaren Bereich. Somit scheint die terminale Modifikation des Aptamers die Bindung des VEGF zu beeinflussen, aber nicht zu verhindern. Es zeigt, dass Cy3-markierte Aptamere als Detektionsmoleküle in den nachfolgenden Microarray-Experimenten eingesetzt werden können.

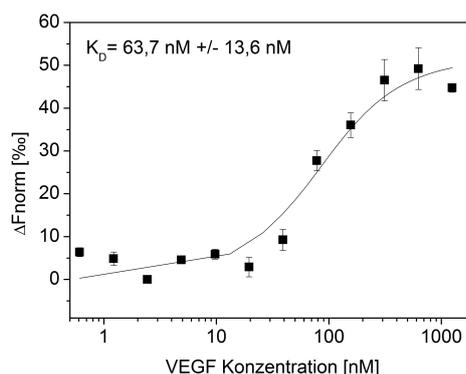
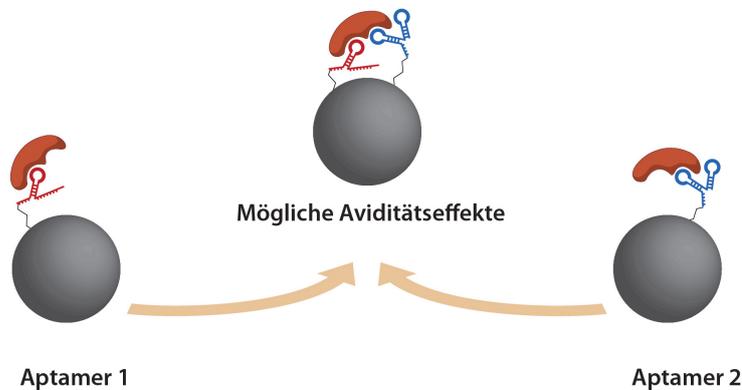


Abbildung 4.3: Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit Cy3-markiertem V7t1.

### Konjugation mit Quantum Dots

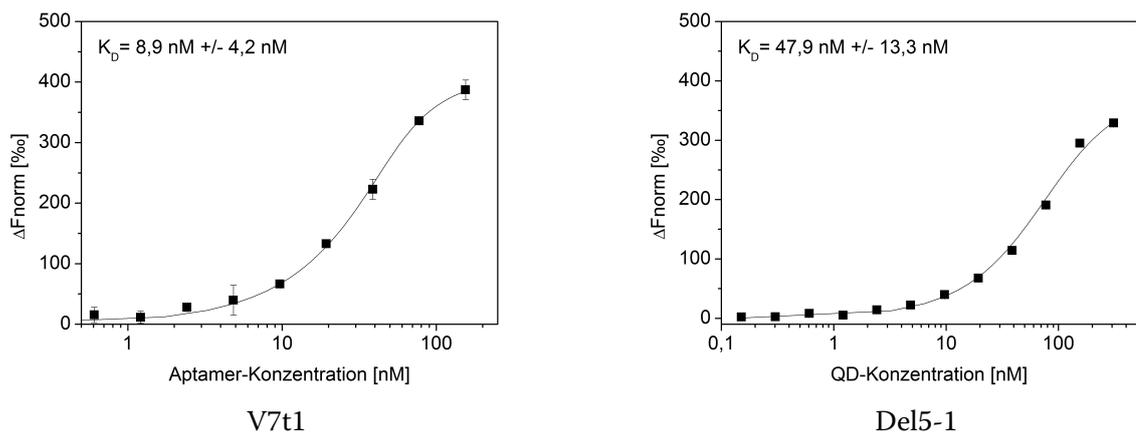
Quantum Dots sind anorganische Nanokristallstrukturen, die ähnlich wie organische Fluorophore durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können und bei Rückkehr in den Grundzustand längerwelliges Licht emittieren. Sie können ebenfalls zur Markierung von Molekülen wie z. B. Aptameren eingesetzt werden, wobei je ein Quantum Dot mit mehreren Aptamermolekülen modifiziert werden kann. Dies erlaubt es nicht nur mehrere Aptamere eines Typs sondern auch mehrere Aptamertypen auf einem Quantum Dot zu immobilisieren. Binden diese Aptamertypen unterschiedliche Epitope des VEGF, so ist es möglich, einen multifunktionalen Aptamerliganden zu generieren, der das VEGF von verschiedenen Seiten bindet (Abbildung 4.4). Dies hat eine erhöhte Avidität, die Gesamtheit aller Affinitäten, zur Folge. Ob diese Aviditätseffekte bei Kopplung zweier Aptamere auftreten und die Bindeaffinität zum VEGF beeinflussen, soll anhand von V7t1- und Del5-1-modifizierten

Quantum Dots untersucht werden.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung der Avidität zweier Quantum-Dot-gekoppelter Aptamere.

Dazu wurde zunächst die Bindeaffinität von V7t1-modifizierten Quantum Dots und Del5-1-modifizierten Quantum Dots zum VEGF bestimmt. Aus den in Abbildung 4.5 dargestellten Bindungskurven wurden  $K_D$ -Werte von 8,9 nM für V7t1 und 47,9 nM für Del5-1-modifizierte Quantum Dots ermittelt. Diese  $K_D$ -Werte sind nicht mit denen vergleichbar, die für Cy3-markierte Aptamere bestimmt wurden, da sie sich auf die Quantum-Dot-Konzentration, nicht die Aptamerkonzentration beziehen. Eine Umrechnung wäre nur möglich, wenn die Anzahl der immobilisierten Aptamere pro Quantum Dot bekannt wäre. Diese konnte jedoch nicht ermittelt werden.



**Abbildung 4.5:** Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit V7t1- oder Del5-1-modifizierten Quantum Dots.

Anschließend wurden Quantum Dots mit einer Mischung aus V7t1- und Del5-1-Aptameren konjugiert und die Bindeaffinität bestimmt. Die entsprechende Bindungskurve ist in Abbildung 4.6 darge-

stellt.

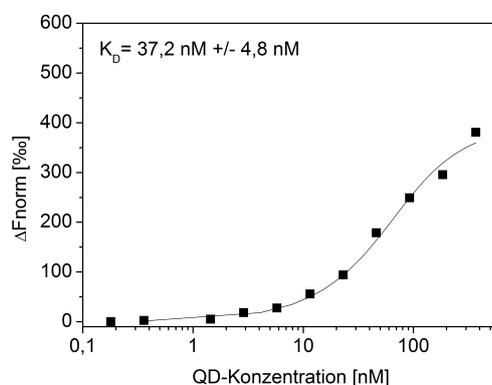


Abbildung 4.6: Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit V7t1- und Del5-1-modifizierten Quantum Dots.

Wie der ermittelte  $K_D$ -Wert von 37,2 nM zeigt, konnte die Bindeaffinität durch den zweizähligen Aptamerliganden nicht wie erwartet verbessert werden. Stattdessen entspricht der ermittelte  $K_D$ -Wert näherungsweise dem Mittelwert der  $K_D$ -Werte der einzelnen Aptamer-Quantum-Dot-Konjugate. Die Avidität scheint somit keinen positiven Einfluss auf die VEGF-Aptamer-Bindung zu haben. Da die Anzahl der Aptamere, die an einen Quantum Dot gebunden sind, zusätzlich variieren kann und nicht genau bestimmt werden kann, eignen sich die Aptamer-Quantum-Dot-Konjugate nicht als Detektionsmoleküle für die folgenden Microarray-Experimente. Stattdessen wurden Cy3-markierte Aptamere eingesetzt.

## 5 Entwicklung von Aptamer-Microarrays zur Detektion von VEGF

Die derzeit verfügbaren kommerzielle Protein-Microarrays zur simultanen Analyse verschiedener Komponenten einer komplexen Probe setzen Antikörper als Detektionsmoleküle ein. Wie in Abschnitt 2.2 gezeigt wurde, stellen Aptamere eine vielversprechende Alternative als Fänger- und Detektionsmolekül dar. Während Antikörper oft gegen Peptide entwickelt werden und diese über Epitope binden, die aus ca. 10–15 Aminosäuren bestehen, werden zur Aptamerselektion meist die kompletten Proteine eingesetzt. Die Aptamer-Protein-Erkennung findet dabei über eine größere Fläche verteilt statt, die auch als „Aptatop“ bezeichnet wird. Aptamere erkennen somit die Oberfläche des Proteins und können möglicherweise auch Konformationsänderungen des Proteins detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Protein-Microarray zur Detektion von VEGF mittels Aptameren etabliert werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Microarray-Formate getestet, deren Funktionsprinzip in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt sind: der *Reverse Phase* und der *Sandwich* Microarray.

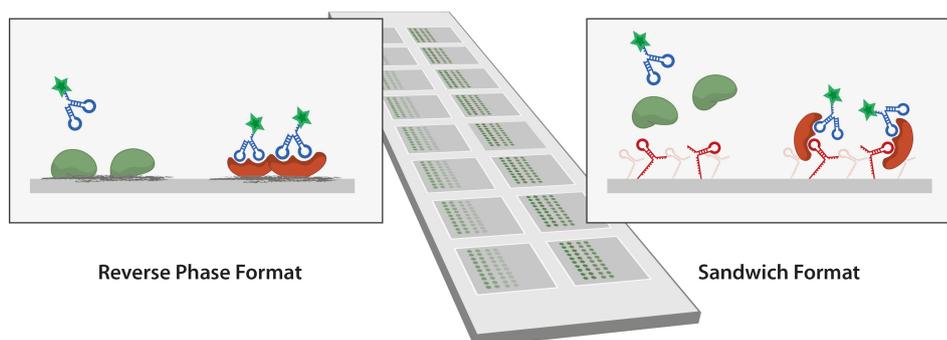


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung eines *Reverse Phase* und eines *Sandwich* Microarrays.

Im *Reverse Phase* Format wird das Zielprotein oder die komplexe Proteinprobe auf einem beschichteten Glasobjektträger immobilisiert und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Detektionsaptamer inkubiert. Dieses Format erlaubt es, mit einem Microarray-Experiment ein Zielprotein parallel und unter identischen experimentellen Bedingungen in einer Vielzahl von Proben nachzuweisen

[155]. Ein kritischer Schritt ist die Immobilisierung der komplexen Probe, da die Proteine hierbei denaturieren können, wobei die Aptatope, an die die Aptamere binden, zerstört werden könnten.

Die Immobilisierung des Zielproteins ist im *Sandwich* Microarray-Format nicht notwendig, stattdessen wird ein Fängeraptamer auf den Glasobjektträger aufgebracht und anschließend mit der Proteinprobe inkubiert. Das Zielprotein wird vom Fängeraptamer gebunden und die Detektion erfolgt mittels eines weiteren Zielprotein-bindenden Aptamers, das fluoreszenzmarkiert ist. Die beiden verwendeten Aptamere müssen gegen unterschiedliche Aptatope des Zielproteins gerichtet sein, damit sie ihr Target gleichzeitig binden können. Durch die doppelte Protein-Aptamer-Interaktion ist die Selektivität eines *Sandwich* Microarrays deutlich höher als die eines *Reverse Phase* Assays [156]. Durch Aufkonzentrieren des Proteins im Spot nach Bindung an das Fängeraptamer weist der Assay weiterhin eine verbesserte Sensitivität auf.

Zunächst wurde ein *Reverse Phase* Microarray etabliert und anhand dessen die Eignung der vier ausgewählten VEGF-bindenden Aptamere als Detektionsmoleküle untersucht. Weiterhin wurde das VEGF in komplexen Proteinproben detektiert. Im Anschluss wurden die etablierten Methoden auf das *Sandwich* Format übertragen, um eine Alternative zum *Reverse Phase* Microarray aufzuzeigen.

## 5.1 Etablierung eines *Reverse Phase* Aptamer-Microarrays

Ein *Reverse Phase* Microarray-Experiment gliedert sich in vier Arbeitsschritte, die in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt sind und von denen jeder einzelne von verschiedenen Parametern beeinflusst wird.

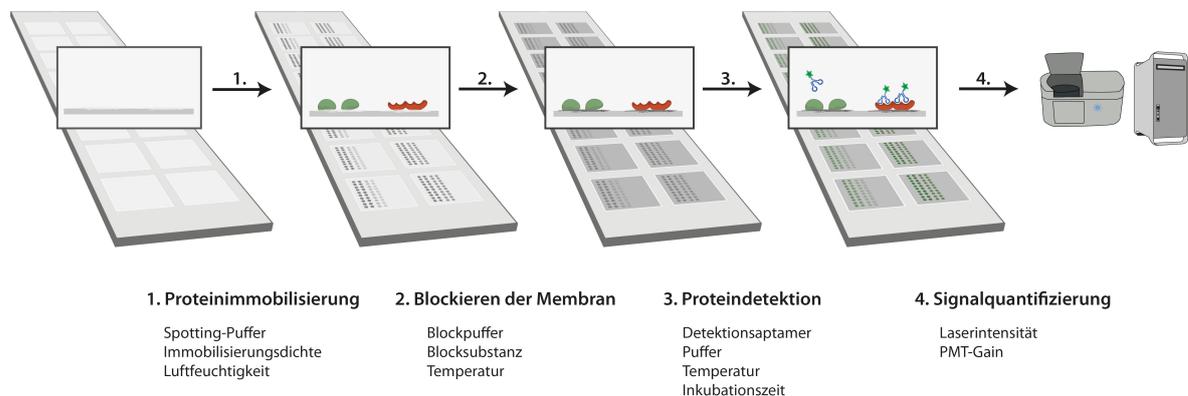


Abbildung 5.2: Ablauf eines *Reverse Phase* Microarray-Experiments und Möglichkeiten zur Optimierung.

Zunächst wird die Proteinlösung auf Glasobjektträgern immobilisiert. Im Rahmen dieser Arbeit werden dazu Nitrocellulose-beschichtete Objektträger verwendet. Insgesamt befinden sich 16 einzelne Nitrocellulosemembranen auf einem Objektträger, auf die mit Hilfe eines vollautomatischen Spotting-Systems das Protein tropfenweise aufgebracht wird. Dabei kann die Gesamtmenge des aufgetragenen Proteins variiert werden und die Immobilisierung kann bei verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten stattfinden. Darüber hinaus ist es möglich, unterschiedliche Spotting-Puffer einzusetzen und ihren Einfluss auf die Immobilisierung zu untersuchen. Auf jede der Membranen wird während des Spotting-Vorgangs ein identisches Muster aus maximal  $10 \times 10$  Spots aufgebracht, wobei im Rahmen dieser Arbeit jedes Protein als Zehnfachreplikat gespottet wurde. Nachdem der Spotting-Puffer komplett eingetrocknet ist, werden verbleibende freie Bindungsplätze auf der Nitrocellulosemembran geblockt. Hierzu werden Substanzen genutzt, die möglichst irreversibel an die Nitrocellulose adsorbieren und nicht mit den Detektionsaptameren interagieren, um das Hintergrundsignal auf ein Minimum zu reduzieren. Sowohl die gewählte Blocksubstanz als auch der Blockpuffer und die Temperatur, bei der der Blockvorgang durchgeführt wird, können hierauf Einfluss nehmen. Als dritter Arbeitsschritt folgt die Inkubation der Detektionsaptamere. Hierzu können die einzelnen Nitrocellulosemembranen mit einem Inkubationsrahmen in einzelne Subarrays abgetrennt werden, die sich jeweils in einer eigenen Inkubationskammer befinden. Jede Kammer kann individuell mit Detektionslösung befüllt werden, so dass parallel 16 verschiedene Inkubationsbedingungen analysiert werden können. Wichtige Parameter, die die Bindung des Detektionsaptamers an das Targetprotein beeinflussen, sind die Konzentration des Detektionsaptamers, die Zusammensetzung des Inkubationspuffers, die Inkubationstemperatur und -zeit. Das Fluoreszenzsignal der gebundenen Detektionsaptamere wird abschließend mit einem Laser-Scanner detektiert, wobei die Laserintensität und die Signalamplifizierung per Photoelektronenvervielfacher (*Photomultiplier Tube*, PMT) variiert werden können. Um Schäden an der Nitrocellulosemembran zu verhindern, wurden alle *Reverse Phase* Microarrays bei einer Laserintensität von 33 % gescannt und lediglich das PMT-Gain an das maximale Fluoreszenzsignal angepasst, so dass dies knapp unterhalb der Sättigung lag.

### 5.1.1 Proteinimmobilisierung

Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, ist ein *Reverse Phase* Microarray-Experiment von diversen Parametern abhängig, so dass in jedem der vier Arbeitsschritte dieses Detektions-Assays Optimierungspotential besteht. Im Folgenden wird die Proteinimmobilisierung genauer betrachtet. Hierbei wurden die Proteinlösungen mit Hilfe eines kontaktfreien Spotting-Systems (Nanoplotter NP 2.1, GeSiM) tropfenweise auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht. Das Volumen eines einzelnen Tropfens des Nanoplotters beträgt laut Herstellerangaben in Kombination mit der verwendeten Spitze NanoTip A–J zwischen 0,2 und 0,4 nL. Das exakte Volumen ist dabei von den eingestellten Spotting-Parametern wie der Spannung und Frequenz abhängig, die bei allen Slides konstant bei 70 V und 100

s<sup>-1</sup> lagen. Außerdem wird es von der Viskosität der Probe beeinflusst. Die Gesamtmenge des auf die Nitrocellulose gespotteten Proteins ist durch die Anzahl der Tropfen, die pro Spot abgegeben werden, und die Proteinkonzentration regulierbar.

Das Blockieren der Nitrocellulosemembran wurde nicht verändert und jeweils mit 1 % BSA in PBS durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Signalintensitäten zu gewährleisten, wurden alle Microarrays bei einer Laserintensität von 33 % und einem PMT-Gain von 280 gescannt.

Als Maß für die Spotqualität wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) eines jeden Spotsignals nach Formel B.2 berechnet. Es ist durch die mittlere Intensität des Nutzsignals im Verhältnis zum mittleren Rauschen des Störsignals definiert [157] und es beschreibt in welchem Maß sich das Spotsignal vom Hintergrund abhebt. In der DNA-Microarray-Technologie wird das Detektionslimit eines Spots durch eine minimale SNR von 3 definiert [158].

Um die optimale Proteinmenge pro Spot zu identifizieren, wurde VEGF in einer Konzentration von 400 µg/mL auf vier Microarrays gespottet, wobei die Tropfenzahl pro Spot variiert wurde. Die Proteinimmobilisierung wurde bei einer Luftfeuchtigkeit von 70 % durchgeführt, da bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, dass die erhöhte Luftfeuchtigkeit positiven Einfluss auf das spätere Microarray-Signal hat [159]. Anschließend wurde der Microarray mit verschiedenen Konzentrationen V7t1 inkubiert und es wurde sowohl die SNR als auch die Signalintensität der Spots betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

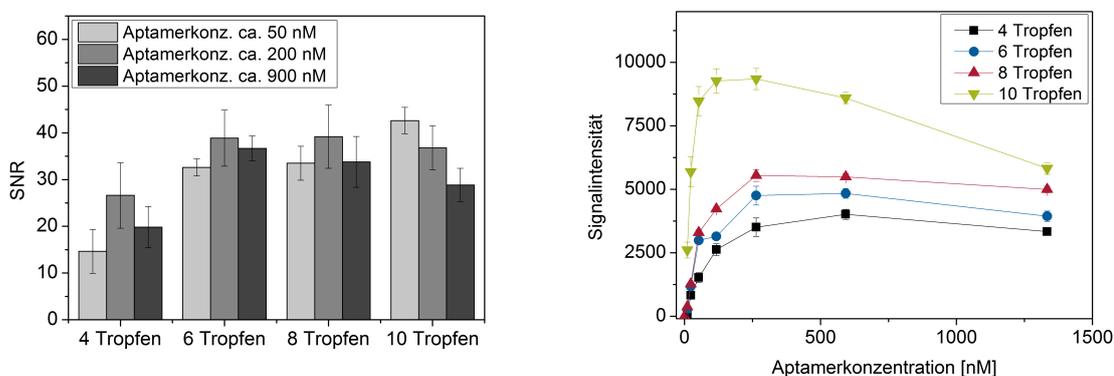


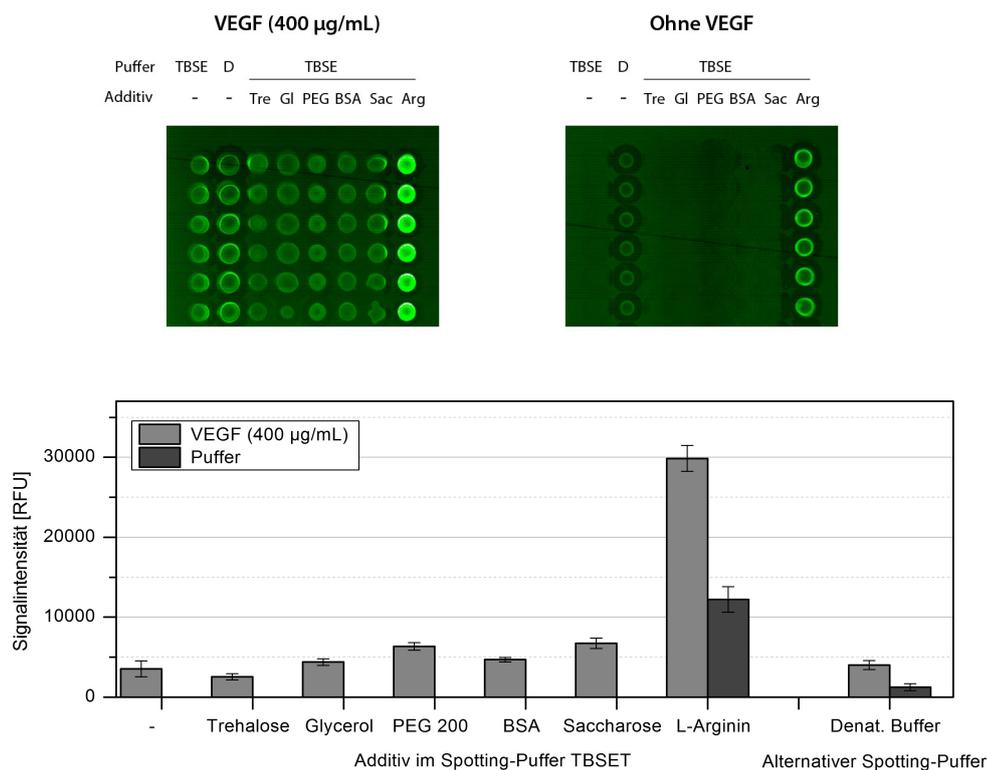
Abbildung 5.3: Einfluss der immobilisierten Proteingestamtheit auf die SNR und Signalintensität.

Das beste Signal-Rausch-Verhältnis ist abhängig von der Konzentration des Detektionsaptamers und wurde bei 6–10 Tropfen pro Spot erzielt, wobei sich bei niedrigen Aptamerkonzentrationen eher eine höhere Tropfenzahl und bei hohen Konzentrationen eine niedrigere Tropfenzahl eignet. Mit steigender Tropfenzahl nahm die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgrund der höheren Probenmenge zu. Gleichzeitig wurde das schnelle Eintrocknen des Spots verhindert, wodurch die Spotfläche zunahm. Wie Abbildung 5.3 rechts zeigt, nimmt die Intensität des Fluoreszenzsignals mit steigender

Konzentration des Detektionsaptamers zu und geht bei einer V7t1-Konzentration von ca. 250 nM in die Sättigung über. Die Signalintensität nimmt mit steigender Tropfenzahl zu, wobei die Kurve des Microarrays mit 10 Tropfen pro Spot nach Erreichen des Maximums deutlich absinkt, während bei geringerem Proteingehalt pro Spot die Signalintensität nahezu konstant bleibt. Dies ist vermutlich auf Quenching-Effekte aufgrund der hohen Fluorophorkonzentration in den Spots zurückzuführen. Für eine mittlere Aptamerkonzentration liefert die Proteinimmobilisierung mit 8 Tropfen pro Spot das qualitativ beste Signal und gleichzeitig hohe Signalintensitäten ohne deutliche Quenching-Effekte. Daher wurde dieser Spotting-Parameter für die folgenden *Reverse Phase* Experimente verwendet. Hier wurde zunächst der Einfluss des Spotting-Puffers auf die Signalintensität untersucht.

Der Spotting-Puffer kann in zweierlei Hinsicht Einfluss auf das Microarray-Signal nehmen. Zum einen ist er das Solvens in dem das Protein gelöst ist und wirkt durch seine Puffereigenschaften wie dem pH-Wert oder der Ionenstärke direkt auf die Konformation und Stabilität des Proteins ein. Zum anderen können Zusätze im Spotting-Puffer seine physikalischen Eigenschaften verändern und so die Benetzung der Nitrocellulosemembran oder das Eintrocknen des Puffers beeinflussen. Dies kann sich sowohl positiv als auch negativ auf die Proteinimmobilisierung und in Folge dessen auf das Fluoreszenzsignal auswirken. In einer vergleichenden Analyse wurden verschiedene Zusätze zum Spotting-Puffer gegeben, die laut Literatur die Konformation von Proteinen in Lösung stabilisieren [160, 161, 162, 163] und das VEGF (Konz. 400 µg/mL) wurde in diesen modifizierten Spotting-Puffern auf den Microarray gespottet. Als Kontrolle wurden die Puffer ohne Proteinzusatz ebenfalls auf den Microarray gespottet. Nach Inkubation mit dem Detektionsaptamer V7t1 wurde die Signalintensität der VEGF-Spots verglichen.

Wie Abbildung 5.4 verdeutlicht, haben Polyethylenglycol (PEG) 200 und Saccharose einen positiven Einfluss auf die Proteinimmobilisierung. BSA und Glycerol bewirkten keine Änderung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum Standard-Spotting-Puffer TBSET-Puffer (*TRIS-buffered saline with EDTA and Tween 20*) und der Einfluss von Trehalose im Bindepuffer ist als negativ zu bewerten. Wie insbesondere auf den Bildern des Microarray-Scans deutlich wird, wird das Fluoreszenzsignal am stärksten durch Zugabe von L-Arginin zum Spotting-Puffer amplifiziert, jedoch sind auch für die reine Puffersubstanz deutliche Spots zu erkennen. Vermutlich geht die basische Aminosäure (pI 10,8) unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Detektionsaptamer ein. Gleiches ist für den denaturierenden Puffer zu beobachten, der als Alternative zum Spotting-Puffer TBSET-Puffer getestet wurde und ebenfalls Arginin (100 mM) enthält. Beide Puffer sind somit als Spotting-Puffer ungeeignet. Sowohl PEG 200 als auch Saccharose können hingegen zur Verbesserung des Fluoreszenzsignals als Supplemente im Spotting-Puffer eingesetzt werden.



**Abbildung 5.4:** Einfluss des Spotting-Puffers auf die Signalintensität.

Als Standard-Spotting-Puffer wurde TBSET-Puffer verwendet. Ihm wurden 0,5 % Trehalose (Tre), 5 % Glycerol (Gl), 5 % PEG 200 (PEG), 0,5 % BSA, 0,5 % Saccharose (Sac) oder 100 mM L-Arginin (Arg) zugegeben und die Signalintensität mit TBSET-Puffer ohne Additiv (-) verglichen. Zusätzlich wurde ein denaturierender Puffer (D) als Spotting-Puffer getestet.

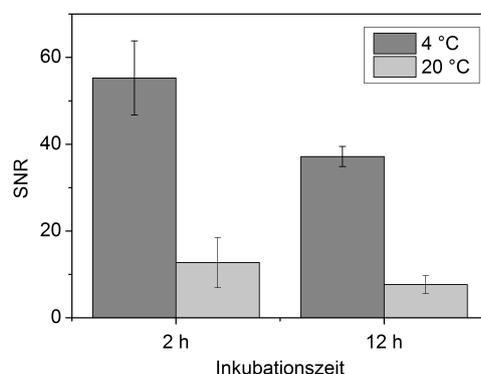
## 5.1.2 Entwicklung des Detektionsassays

### Untersuchung der Detektionsbedingungen

Der zweite kritische Arbeitsschritt eines *Reverse Phase* Microarray Experiments ist die Inkubation des Detektionsaptamers. Die Bedingungen während der Detektion müssen die Faltung des Aptamers und die Bindung an das Targetprotein ermöglichen, und gleichzeitig unspezifische Bindungen an Nicht-Targetproteine oder die Nitrocellulosemembran weitestgehend verhindern. Neben dem Detektionsaptamer, seinem Inkubationspuffer, der optimalen Aptamerkonzentration sowie der Aptamermodifikation sind die Inkubationszeit und -temperatur entscheidende Faktoren für die Qualität des generierten Fluoreszenzsignals.

Der Einfluss der Inkubationszeit und der -temperatur wurde anhand des Aptamers V7t1 untersucht. Alle Aptamer-spezifischen Detektionsparameter werden im folgenden Kapitel genauer betrachtet. Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, wird die beste Signalqualität bei 4 °C und einer Inkubationsdauer des Detektionsaptamers von zwei Stunden erzielt. Die Aptamer-Protein-Bindung scheint bei 4 °C gegenüber 20 °C begünstigt zu sein, weiterhin ist das Gleichgewicht der Bindung bereits nach zwei

Stunden erreicht, so dass eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht zur Steigerung des Fluoreszenzsignals führte, sondern stattdessen zu einem verstärkten Hintergrundsignal und in Folge dessen zu einem Abfall der SNR.



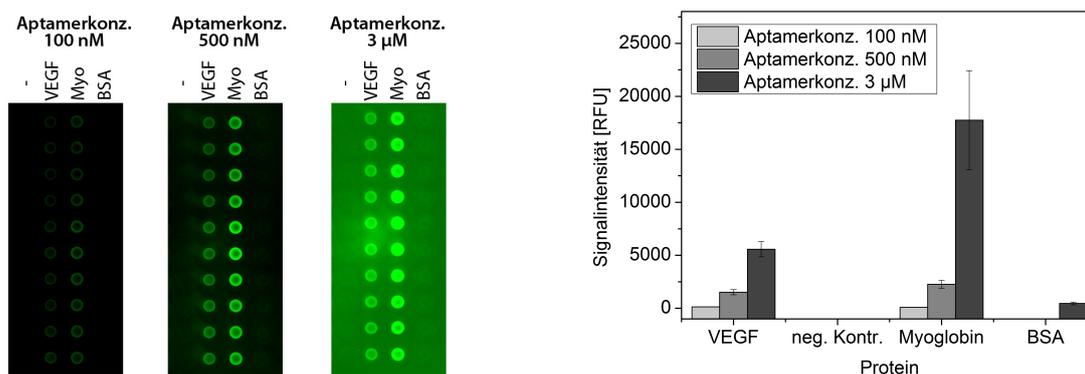
**Abbildung 5.5:** Abhängigkeit der Signalqualität von der Inkubationsdauer und Temperatur.

Untersucht wurde jeweils die Bindung des Aptamers V7t1 an VEGF (800 µg/mL) bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C und 20 °C und einer Inkubationszeit von 2 h bzw. 12 h. Die Konzentration des Detektionsaptamers betrug 100 nM.

### Untersuchung der Bindespezifität

Zur Untersuchung der VEGF-Bindesepezifität des Aptamers V7t1 im *Reverse Phase* Microarray-Experiment wurde zunächst reines VEGF (200 µg/mL) im Spotting-Puffer PBS auf Nitrocellulose-beschichteten Microarrays immobilisiert. Weiterhin wurden als Negativkontrollen PBS ohne Protein-zusatz sowie die Kontrollproteine Myoglobin und BSA auf den Objektträger gespottet. Myoglobin und BSA weisen unterschiedliche isoelektrische Punkte auf, wobei das BSA mit einem pI von 4,7 saure Proteine repräsentiert und das Myoglobin (pI 6,8/7,2) einen ähnlichen isoelektrischen Punkt wie das VEGF besitzt. Um die unspezifischen Bindungen unter realen Bedingungen zu untersuchen, wurden die Kontrollproteine in höherer Konzentration (1 mg/mL) als das VEGF gespottet, da auch in einer komplexen Probe ein Überschuss an Fremdprotein zu erwarten ist. Nach Blockieren der Membran mit 1 % BSA ins PBS wurden alle Proteine parallel mit verschiedenen Konzentrationen des Detektionsaptamers V7t1 im Bindepuffer TBSE inkubiert. Nach Scannen der Slides wurde die relative Signalintensität der einzelnen Spots aus der Differenz des mittleren Spotsignals und des mittleren Hintergrundsignals berechnet. Im Folgenden wird dies verkürzt als „Signalintensität“ bezeichnet. Die Proteinspots bei niedriger, mittlerer und hoher Aptamerkonzentration sowie die entsprechenden Signalintensitäten sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Es wird deutlich, dass das Aptamer V7t1 an VEGF bindet, jedoch keine Wechselwirkungen mit der Nitrocellulosemembran oder Bestandteilen des Spotting-Puffers PBS eingeht. Bei niedriger und mittlerer Aptamerkonzentration sind ebenfalls keine Interaktionen mit BSA nachweisbar, lediglich eine hohe Konzentration des Detektionsaptamers führt

zu unspezifischen Bindungen. Das Fluoreszenzsignal des Myoglobins hingegen ist im niedrigen und mittleren Bereich mit dem des VEGF vergleichbar und übersteigt dieses bei hoher Konzentration um mehr als das Doppelte. Mit dem Ziel diese unspezifischen Bindungen zu minimieren, werden sie im folgenden Abschnitt genauer charakterisiert.



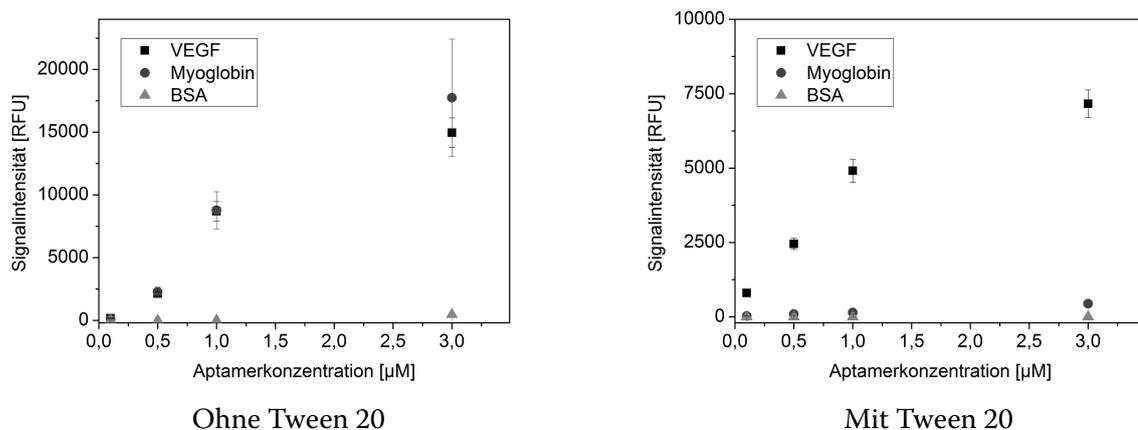
**Abbildung 5.6:** Nachweis der Bindung des V7t1 an VEGF per *Reverse Phase* Microarray.

Das VEGF wurde in einer Konz. von 0,2 mg/mL gespottet, BSA und Myoglobin jeweils in einer Konz. von 1,0 mg/mL.

### Charakterisierung unspezifischer Wechselwirkungen

Um die unspezifischen Wechselwirkungen des Aptamers V7t1 mit dem Myoglobin genauer zu untersuchen, wurde der oben beschriebene Assay mehrfach wiederholt wobei die Aptamerinkubation sowie die Waschschrte nach der Inkubation variiert wurden. Durch stringenteres Waschen durch verlängerte Waschzeiten und Erhöhung der Ionenstärke im Waschpuffer konnte das Fluoreszenzsignal für Myoglobin zwar reduziert werden, allerdings verringerte sich gleichzeitig das Signal für VEGF (Daten nicht gezeigt). Es war nicht möglich, die unspezifisch gebundenen Aptamere wieder vom Myoglobin zu lösen. Daher wurde der Fokus auf die Aptamerinkubation gerichtet. Da die unspezifischen Wechselwirkungen zum Myoglobin (pI 6,8/7,2), nicht aber zum BSA (pI 4,7) auftreten, wurde aufgrund der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte und der daraus resultierenden unterschiedlichen Ladungen der Proteine vermutet, dass die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt wird. Daher wurde durch Zusatz von Natriumchlorid zum Bindepuffer die Ionenstärke erhöht, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen verringert werden. Da hierdurch das Signal des Myoglobins nicht signifikant reduziert wurde (Daten nicht gezeigt), konnten unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden.

Stattdessen wurde der Einfluss hydrophober Wechselwirkungen analysiert, indem diese durch Zusatz von 0,05 % Tween 20 zum Bindepuffer gehemmt wurden. Wie Abbildung 5.7 zeigt, reduzierte sich die maximale Signalintensität des VEGF durch Zusatz von Tween 20 auf 50 %, die des Myoglobin



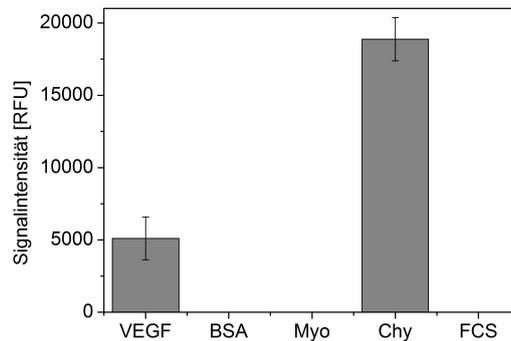
**Abbildung 5.7:** Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen zwischen V7t1 und Myoglobin durch Zusatz von 0,05 % Tween 20 zum Bindepuffer.

Das VEGF wurde in einer Konz. von 0,2 mg/mL gespottet, BSA und Myoglobin jeweils in einer Konz. von 1,0 mg/mL.

auf 2,5 % im Vergleich zum Bindepuffer ohne Tween 20. Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen somit sowohl an der Bindung des Aptamers an VEGF als auch an das Myoglobin beteiligt zu sein. Da die unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Myoglobin auf diese Weise unterbunden werden konnten, wurden alle weiteren Microarray-Experimente mit Zusatz von Tween 20 im Bindepuffer durchgeführt. Dieser modifizierte Bindepuffer wird im Folgenden als TBSET (TBSE + Tween 20) bezeichnet.

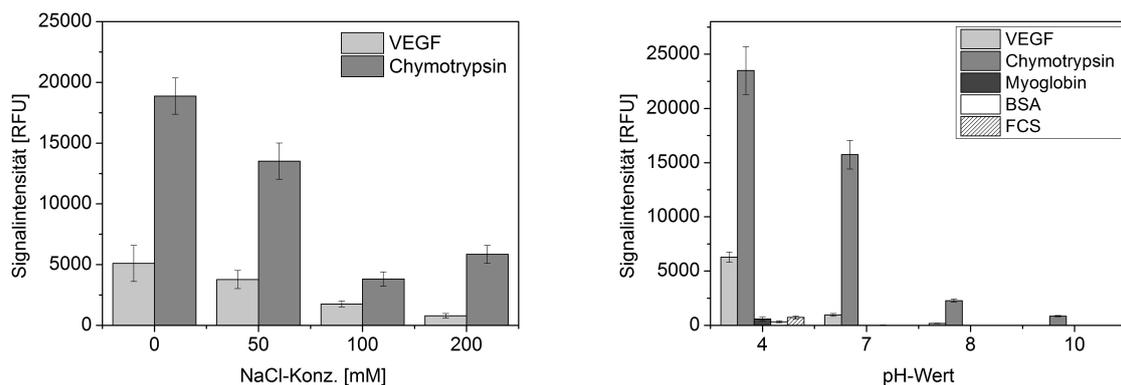
Mit dem veränderten Bindepuffer wurde der *Reverse Phase* Microarray Assay auf elektrostatisch kontrollierte unspezifische Bindungen gegenüber Nicht-Targetproteinen, sowie unspezifische Bindungen gegenüber einer komplexen Proteinprobe untersucht. Als Kontrollproteine wurden zum einen BSA als Repräsentant für negativ geladene Proteine, Myoglobin als neutrales Protein und  $\alpha$ -Chymotrypsin als positiv geladenes Protein eingesetzt. Als komplexe Negativkontrolle diente FCS, das aus einem Gemisch von Blutserumproteinen besteht, unter denen sich einige Wachstumsfaktoren und somit VEGF-ähnliche Proteine befinden. Für eine Vergleichbarkeit der Signalintensitäten wurden alle Proteine in einer Konzentration von ca. 500  $\mu$ g/mL gespottet. Wie Abbildung 5.8 zeigt, wurde keine unspezifische Bindung an BSA, Myoglobin und FCS, jedoch eine starke Bindung an  $\alpha$ -Chymotrypsin nachgewiesen. Eine solche Protein-DNA-Interaktion wurde für das  $\alpha$ -Chymotrypsin bereits in Verbindung mit genomischer DNA beschrieben. Anhand von Verdrängungsexperimenten wurde gezeigt, dass die DNA über positiv geladene basische Aminosäuren auf der Proteinoberfläche gebunden wird, wobei keine spezifische Binderegion identifiziert wurde [164].

Aufgrund seiner positiven Ladung unter den gegebenen Detektionsbedingungen ist es möglich, dass die Bindung des  $\alpha$ -Chymotrypsins an das Aptamer V7t1 auf elektrostatischen Wechselwirkungen zum negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat des Aptamers basiert. Um diese Theorie zu bestätigen,



**Abbildung 5.8:** Untersuchung der Bindung von V7t1 an VEGF und Nicht-Targetproteine im *Reverse Phase* Microarray. Alle Proteine wurden in einer Konzentration von ca. 500 µg/mL gespottet.

wurden die Detektionsexperimente mit modifiziertem Aptamerbindepuffer wiederholt. Mit dem Ziel, die elektrostatischen Wechselwirkungen zu verringern, wurde zum einen durch Erhöhung der Natriumchloridkonzentration die Ionenstärke des Bindepuffers erhöht, zum anderen wurde der pH-Wert variiert, der die Ladung der Proteine direkt beeinflusst. Abbildung 5.9 stellt links die Signalintensität des VEGF- und  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration im Bindepuffer dar. Mit steigender Ionenstärke des Puffers nimmt sowohl die Signalintensität des VEGF als auch des  $\alpha$ -Chymotrypsin ab, was in beiden Fällen auf eine elektrostatisch kontrollierte Interaktion zwischen Aptamer und Protein hinweist. Unabhängig vom Salzgehalt des Puffers ist das Signal des  $\alpha$ -Chymotrypsins dabei mehr als doppelt so hoch wie das des VEGF, was aufgrund des basischen isoelektrischen Punktes von 8,75 im Vergleich zum VEGF (pI 7,58) erklärbar ist.



**Abbildung 5.9:** Abhängigkeit unspezifischer Bindungen des V7t1 vom Salzgehalt und pH-Wert des Bindepuffers. Alle Proteine wurden in einer Konzentration von ca. 500 µg/mL gespottet.

In Abbildung 5.9 ist die Abhängigkeit der Protein-Aptamer-Interaktion vom pH-Wert des Bindepuffers dargestellt. Es wird deutlich, dass mit sinkendem pH-Wert die unspezifischen Bindungen des

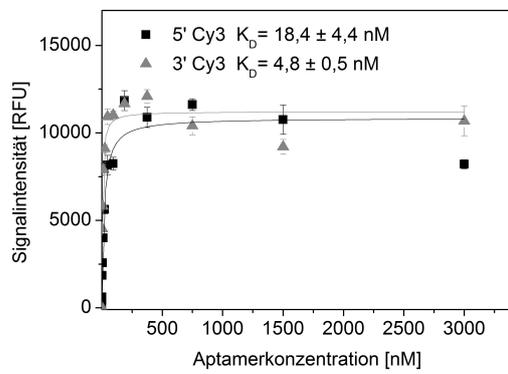
Aptamers stärker werden. Während bei pH 7, dem pH-Wert des ursprünglich verwendeten Bindepuffers, nur ein Signal für VEGF und  $\alpha$ -Chymotrypsin detektiert wurde, ist bei pH 4 auch eine schwache, aber detektierbare Interaktion des V7t1 mit Myoglobin, BSA und FCS vorhanden. Mit steigendem pH-Wert nimmt sowohl die Signalintensität des VEGF als auch die des  $\alpha$ -Chymotrypsins ab, wobei wiederum unabhängig vom pH-Wert das Signal des  $\alpha$ -Chymotrypsins stärker ist als das des VEGF. Die Abhängigkeit der Signalintensitäten vom pH-Wert des Bindepuffers bestätigt die Theorie einer elektrostatisch kontrollierten Protein-Aptamer-Interaktion und zeigt gleichzeitig die Grenzen eines Aptamer-basierten *Reverse Phase* Assays auf: Hohe Konzentrationen basischer Proteine können die spezifische Detektion des VEGF in einer komplexen Probe verhindern. Daher ist es notwendig entsprechende Negativkontrollen durchzuführen und störende Proteine gegebenenfalls vor dem Microarray-Experiment abzutrennen.

### 5.1.3 Charakterisierung der Aptamer-Protein-Bindung

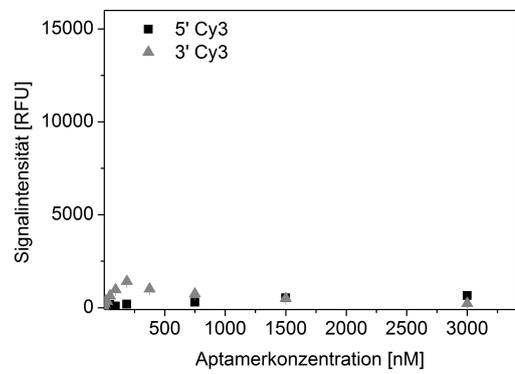
Die Optimierung der Spotting- und Detektionsbedingungen während des *Reverse Phase* Microarray-Experiments wurden anhand des Modellaptamers V7t1 durchgeführt, ohne andere Aptamere zu betrachten. Für eine spezifische und sensitive Detektion des Targetproteins VEGF ist die Wahl des richtigen Detektionsmoleküls mit möglichst hoher Affinität zum VEGF entscheidend. Daher wurde die Affinität der vier ausgewählten VEGF-bindenden Aptamere sowie des Kontrollaptamers 266 zum VEGF untersucht. Während in 4.3 bereits die Aptamer-VEGF-Bindung in Lösung analysiert wurde, wird hier die Affinität zum immobilisierten VEGF betrachtet. Da die Konjugation des Aptamers mit dem Fluorophor Cy3 unerlässlich ist, jedoch möglicherweise die Aptamerfaltung beeinflusst, wurde jedes Aptamer jeweils mit Fluoreszenzmarkierung am 3'- und 5'-Terminus getestet. Anschließend wurde für jedes Aptamer die optimale Konzentration zur VEGF-Detektion bestimmt und unter Berücksichtigung der optimierten Bedingungen wurde die unspezifische Bindung an BSA, Myoglobin und  $\alpha$ -Chymotrypsin untersucht.

#### Aptamer-Affinitäten zum VEGF

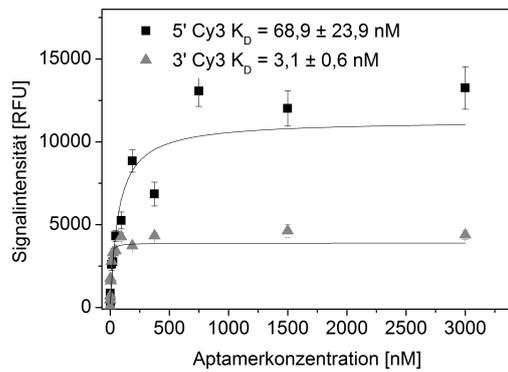
Zur Bestimmung der Affinität der einzelnen Aptamere zum VEGF wurde das Protein unter Berücksichtigung der optimierten Parameter auf den Microarray gespottet und anschließend bei 4 °C für 2 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Detektionsaptamers inkubiert. Nach dem Scannen des Microarrays wurde die Signalintensität der VEGF-Spots bestimmt und wie in Abbildung 5.10 dargestellt gegen die Aptamerkonzentration aufgetragen. Durch nicht-lineare Kurvenanpassung unter Verwendung der Hill-Gleichung B.3 [165] wurde die Dissoziationskonstante  $K_D^*$  der Interaktion zwischen Aptamer und VEGF berechnet. Im Gegensatz zur Charakterisierung der Affinität per MST



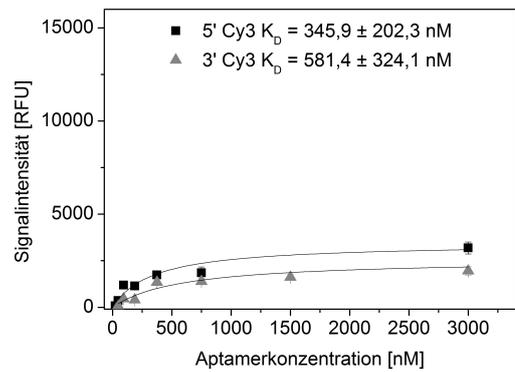
V7t1



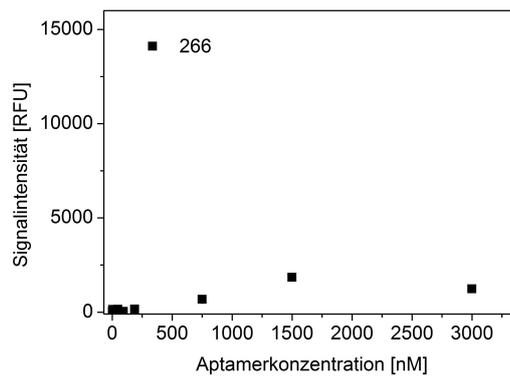
Del5-1



33t5



SL2B



266

Abbildung 5.10: Bindungskurven der Interaktion von VEGF mit den VEGF-bindenden Aptameren V7t1, Del5-1, 33t5, SL2B sowie dem Kontrollaptamer 266.

(Abschnitt 4.3) war es im Microarray-Format nicht möglich, den  $K_D$ -Wert per Massenwirkungsgesetz zu berechnen, da die Gesamtmenge des auf dem Microarray immobilisierten VEGF nicht exakt bestimmt werden kann. Im Gegensatz zum  $K_D$ -Wert, der ein Maß für die Affinität darstellt, das unabhängig von der Konzentration der beiden Bindungspartner ist, beschreibt der  $K_D^*$ -Wert die Konzentration eines Bindungspartners, der einen halbmaximalen Effekt erzielt [166], [167]. Im hier durchgeführten Microarray-Experiment entspricht dies der Aptamerkonzentration, bei der die halbmaximale Intensität des Fluoreszenzsignals erreicht wird. Der  $K_D^*$ -Wert ist von der Gesamtmenge des immobilisierten VEGF abhängig und somit nur systemintern vergleichbar.

Wie in Abbildung 5.10 ersichtlich, weist das Aptamer V7t1 unabhängig von der Position der Fluoreszenzmarkierung am 3' oder 5'-Terminus mit  $K_D^*$ -Werten von 4,8 nM und 18,4 nM eine hohe Bindeaffinität zum VEGF auf. Das Aptamer 33t5 mit Fluoreszenzmarkierung am 3'-Terminus weist mit 3,1 nM die höchste Affinität auf, erreicht jedoch eine deutlich schwächere maximale Fluoreszenzintensität als das 5'-markierte Aptamer, dessen Affinität mit 68,9 nM ebenfalls im niedrigen nanomolaren Bereich liegt. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Markierungseffizienzen der Aptamere zurückzuführen. Das Aptamer SL2B zeigte ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal und ist daher kaum als Affinitätsligand zur VEGF-Detektion geeignet. Eine präzise Bestimmung der Bindeaffinität war aufgrund der geringen Signalintensität nicht möglich, so dass die ermittelten  $K_D^*$ -Werte von  $581,4 \text{ nM} \pm 324,1 \text{ nM}$  (Cy3-Markierung am 3'-Terminus) und  $345,9 \text{ nM} \pm 202,3 \text{ nM}$  (Cy3-Markierung am 5'-Terminus) Standardabweichungen von über 50 % aufwiesen. Für das Aptamer Del5-1 konnte keine Bindung zum VEGF nachgewiesen werden. Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale waren vergleichbar mit denen des Aptamers 266, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde und dessen Bindungskurve ebenfalls in Abbildung 5.10 dargestellt ist.

Im Gegensatz zum EMSA wurden somit im *Reverse Phase* Microarray-Format Unterschiede in der Bindeaffinität der verschiedenen Aptamere zum VEGF sichtbar. Möglicherweise sind diese auf die Immobilisierung des VEGF zurückzuführen, bei der das Protein seine Konformation verändert. Die Aptamere Del5-1 und SL2B gehen aus dem gleichen Ursprungsaptamer hervor und sind daher vermutlich gegen das gleiche Aptatop gerichtet. Möglicherweise wird dieses während der VEGF-Immobilisierung zerstört oder unzugänglich, so dass keine Bindung der Aptamere mehr stattfinden kann.

Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Aptatope, gegen die V7t1 und 33t5 gerichtet sind, auch nach der Immobilisierung als stabil. Aufgrund ihrer geringen  $K_D^*$ -Werte eignen sich diese Aptamere als Detektionsmoleküle im *Reverse Phase* Microarray-Experiment. Im folgenden Abschnitt wird ihre optimale Konzentration zur Detektion von VEGF ermittelt.

### Optimale Konzentration des Detektionsaptamers

Die Wahl der richtigen Konzentration des Detektionsmoleküls ist für die Sensitivität eines Proteindetektions-Assays entscheidend. Bei geringer Aptamerkonzentration ist das Fluoreszenzsignal gering, bei hoher Aptamerkonzentration besteht die Gefahr der unspezifischen Bindung an Nicht-Targetproteine sowie ein hohes Hintergrundsignal. Um die optimale Konzentration für die einzelnen Aptamere zu identifizieren wurde die SNR der VEGF-Spots bei verschiedenen Aptamerkonzentrationen verglichen. Dies ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

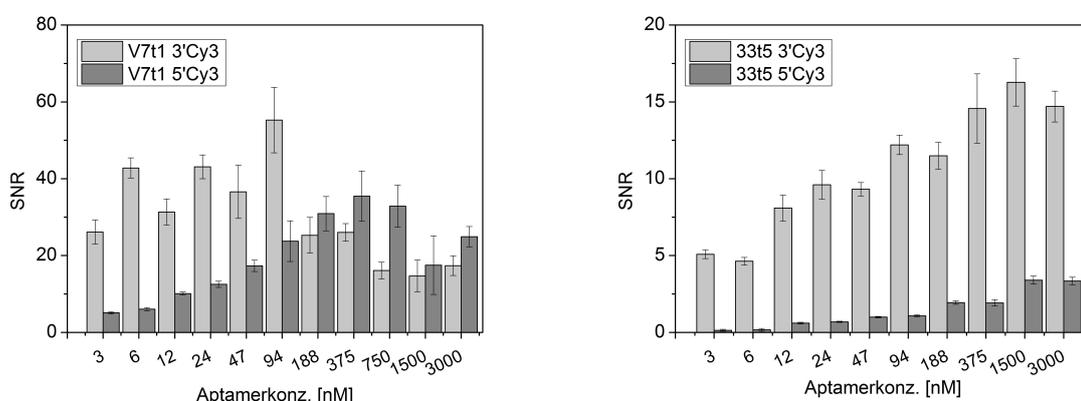
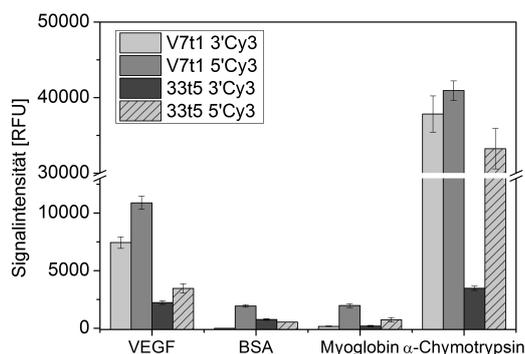


Abbildung 5.11: Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration zur Detektion von VEGF.

Für beide Aptamere nahm die SNR mit steigender Aptamerkonzentration zu. Für das Aptamer V7t1 erreichte sie ihr Maximum bei einer Konzentration von 94 nM (Cy3-Markierung am 3'-Terminus) und 375 nM (Cy3-Markierung am 5'-Terminus). Im Falle des Aptamers 33t5 war das Maximum erst bei 1500 nM erreicht. Bei weiterer Steigerung der Aptamerkonzentration sank die SNR aufgrund des steigenden Hintergrundsignals und möglicherweise auch aufgrund von Quenching-Effekten wieder. Die SNR-Werte des 5'-Cy3-markierten Aptamers 33t5 sind trotz eines ca. doppelt so hohen Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 5.10) deutlich geringer als die des 3'-Cy3-markierten 33t5. Dies wird durch ein hohes Rauschen des Hintergrundsignals verursacht. Am Punkt der maximalen SNR liegt die optimale Konzentration des jeweiligen Detektionsaptamers. In den folgenden Experimenten diene sie als Orientierung in welcher Konzentration welches Aptamer zur VEGF-Detektion eingesetzt wird. Sie sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

### Spezifität der Detektionsaptamere

Für die Detektion des VEGF in einer komplexen Proteinprobe ist die Bindespezifität des Detektionsaptamers ein entscheidender Faktor. Diese soll bei den optimierten Detektionsbedingungen für die vier Aptamervarianten anhand der Proteine BSA, Myoglobin und  $\alpha$ -Chymotrypsin untersucht wer-



**Abbildung 5.12:** Untersuchung der Bindspezifität der Aptamere V7t1 und 33t5 gegenüber BSA, Myoglobin und  $\alpha$ -Chymotrypsin.

den. Hierzu wurden die jeweiligen Proteine in einer Konzentration von 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf den Microarray gespottet und mit den unterschiedlichen Aptameren im jeweils optimierten Konzentrationsbereich inkubiert. Anschließend wurde die Signalintensität des Fluoreszenzsignals verglichen. Eine grafische Darstellung ist in Abbildung 5.12 gezeigt.

Es zeigt, dass alle vier Aptamervarianten an VEGF, aber kaum an BSA und Myoglobin binden. Dagegen treten, wie bereits in Abbildung 5.8 für das Aptamer V7t1 deutlich wurde, starke Wechselwirkungen mit dem  $\alpha$ -Chymotrypsin auf, die zu einem bis zu 9-fach stärkeren Fluoreszenzsignal führen. Lediglich das 33t5 mit Modifikation am 3'-Terminus zeigt ein vergleichsweise geringes Signal für  $\alpha$ -Chymotrypsin. Gleichzeitig ist jedoch auch das VEGF-Signal deutlich schwächer als das der anderen Aptamerkandidaten. Die sequenzunabhängige Bindung des  $\alpha$ -Chymotrypsins an alle Aptamere bestätigt die Theorie von Narayanan und Pal, die von unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen DNA und  $\alpha$ -Chymotrypsin ausgehen [164]. Insgesamt weist das Aptamer V7t1 mit Cy3-Modifikation am 3'-Terminus die höchste Spezifität zum VEGF auf. Gegenüber dem VEGF zeigt es die zweithöchste Signalintensität, die Bindung an BSA und Myoglobin ist dagegen kaum nachweisbar.

## Zusammenfassung

Durch Optimierung verschiedener Assay-Parameter wurde ein Aptamer-Microarray im *Reverse Phase* Format etabliert, der zur Detektion von VEGF in komplexen Proben eingesetzt werden kann. Ist die Probe reich an basischem Fremdprotein, können dabei unspezifische Wechselwirkungen auftreten. Je nach Zusammensetzung der Probe ist es möglicherweise notwendig, die störenden Komponenten vor Durchführung des Microarray-Experiments abzutrennen. Als optimale Bedingungen zur Proteinimmobilisierung haben sich das kontaktlose Spotten bei erhöhter Luftfeuchtigkeit mit 8 Tropfen pro Spot und Zusatz von PEG 200 im Spotting-Puffer TBSET-Puffer erwiesen. Die Detektion wurde

bei 4 °C für zwei Stunden durchgeführt. Außerdem wurde für die Aptamere V7t1 und 33t5 die optimale Konzentration zur VEGF-Detektion ermittelt. Diese sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Analysen zeigten weiterhin, dass die beiden Aptamere Del5-1 und SL2B sich nicht zum Einsatz als Detektionsmolekül im *Reverse Phase* Format eignen.

**Tabelle 5.1:** Bindeaffinität und Optimale Aptamerkonzentration zur Detektion im *Reverse Phase* Microarray.

Aptamer	Position des Fluorophors	$K_D^*$ [nM]	Optimale Aptamerkonz. zur Detektion [nM]	Eignung zur VEGF-Detektion im <i>Reverse Phase</i> Format
V7t1	3'	$4,8 \pm 0,5$	94	Ja
V7t1	5'	$18,4 \pm 4,4$	375	Ja
Del5-1	3'	Keine Bindung	-	Nein
Del5-1	5'	Keine Bindung	-	Nein
33t5	3'	$3,1 \pm 0,6$	375–1500	Bedingt*
33t5	5'	$68,9 \pm 23,9$	1500	Ja
SL2B	3'	$581,4 \pm 324,1$	-	Nein
SL2B	5'	$345,9 \pm 202,3$	-	Nein

\*Aufgrund der geringen Signalintensität (siehe Abbildung 5.10)

#### 5.1.4 Detektion von VEGF

##### Bestimmung der Nachweisgrenze und des dynamischen Bereichs

Zwei wichtige Kennwerte zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit eines Detektions-Assays sind die Nachweisgrenze und der dynamische Bereich. Die Nachweisgrenze ist ein Maß für die Sensitivität des Assays und wird in Anlehnung zur DNA-Microarray-Technologie durch eine  $SNR > 3$  definiert [158]. Ab diesem Signal-Rausch-Verhältnis hebt sich das Fluoreszenzsignal eines Proteinspots signifikant vom Rauschen des Hintergrundsignals ab. Oberhalb der Nachweisgrenze beginnt der dynamische Bereich des Assays. Er beschreibt den Konzentrationsbereich des Analyten, innerhalb dessen eine Signalintensität eindeutig einer Analytenkonzentration zugeordnet werden kann. Im Idealfall kann der Zusammenhang zwischen Detektionssignal und Proteinkonzentration mit einer linearen Funktion beschrieben werden, die in der Regel an der unteren und oberen Grenze des dynamischen Bereichs in eine Kurve übergeht. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze und des dynamischen Bereichs des Microarray-Assays unter Verwendung der verschiedenen Aptamere wurde VEGF in einer 1:2-Verdünnungsreihe gespottet und anschließend mit dem jeweiligen Aptamer inkubiert. Anschließend wurden die SNR und die Signalintensität berechnet und gegen die VEGF-Konzentration aufgetragen. Sie sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

Wie aus der Auftragung der SNR gegen die VEGF-Konzentration deutlich wird, lag die Nachweisgrenze des V7t1 unabhängig von der Position der Cy3-Markierung bei 50 µg/mL (1,1 µM). Der dynamische Bereich erstreckte sich bis zu einer Konzentration von 750 µg/mL (17 µM), wobei die Kurve

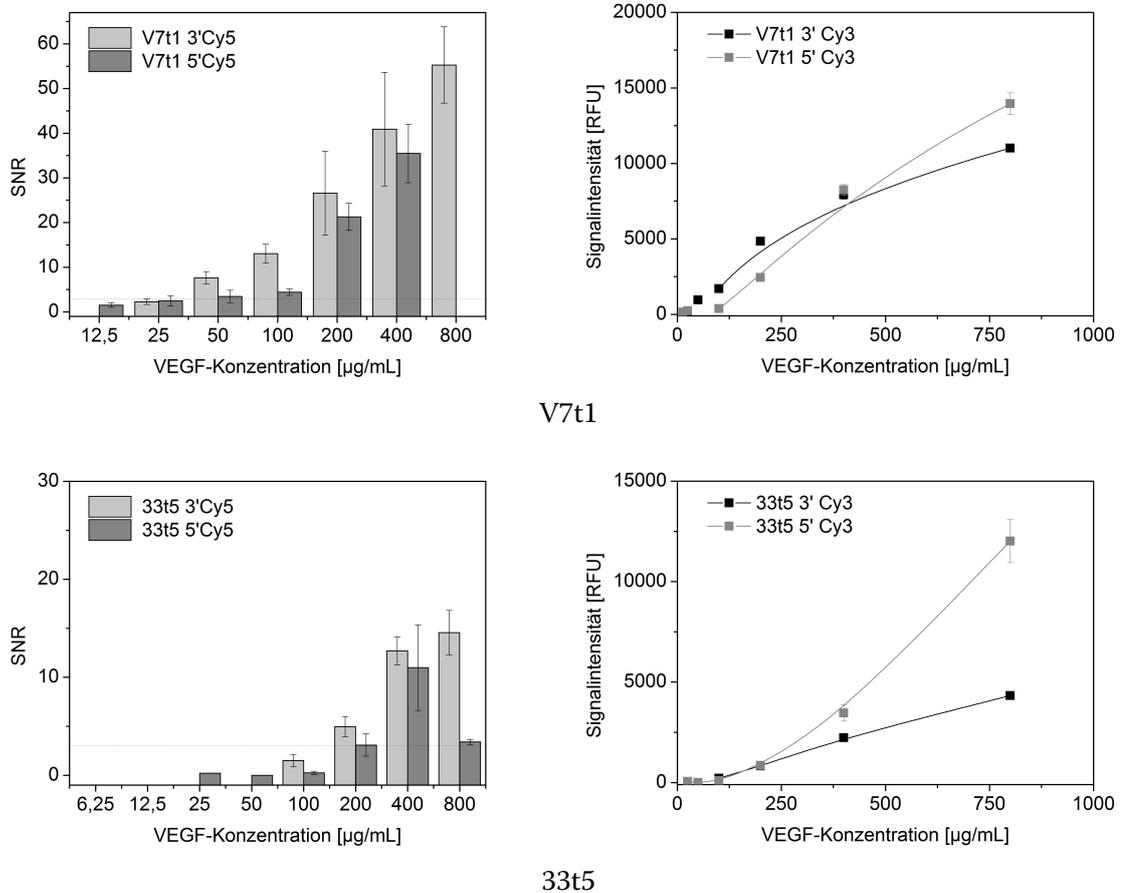


Abbildung 5.13: Nachweisgrenzen und dynamische Bereiche der VEGF-Detektion mit den Aptameren V7t1 und 33t5.

des 3'-terminal markierten V7t1 bereits ab einer Konzentration von 400 µg/mL deutlich erkennbar abflachte. Die Kurve des 5'-Cy3 markierten V7t1 hingegen war im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich linear, was vermuten lässt, dass der dynamische Bereich über eine Konzentration von 800 µg/mL hinausreicht.

Die Nachweisgrenze bei Verwendung des Detektionsaptamers 33t5 war ebenfalls unabhängig von der Position des Fluorophors und lag mit einer Konzentration von 200 µg/mL (4,4 µM) deutlich über der des V7t1. Der dynamische Bereich wurde hier ebenfalls nur bis zu einer Konzentration von 800 µg/mL untersucht. Der Kurvenverlauf deutet allerdings darauf hin, dass die obere Grenze des dynamischen Bereichs deutlich oberhalb dieser Konzentration lag.

Im Vergleich der beiden Aptamere ist das V7t1 aufgrund seiner geringeren Nachweisgrenze für eine sensitive VEGF-Detektion besser geeignet als das 33t5. In den folgenden Versuchen zur VEGF-Detektion aus komplexen Proteinlösungen wurde daher das V7t1 als Detektionsmolekül eingesetzt.

### VEGF-Detektion in komplexen Proteinproben

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit des *Reverse Phase* Microarrays zur VEGF-Detektion wurden zunächst verschiedene komplexe Proteinproben aus einer jeweils definierten Menge FCS und VEGF hergestellt. FCS besteht zu großen Teilen aus BSA, enthält aber auch diverse Wachstumsfaktoren, Immunglobuline und kleine Moleküle wie Hormone, Aminosäuren, Saccharide und Lipide [168]. Die komplexen Proben wurden mit Hilfe des etablierten *Reverse Phase* Microarrays unter Verwendung von V7t1 als Detektionsaptamer analysiert. Zum einen wurde VEGF in einer Endkonzentration von 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zu FCS in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,125 und 2  $\text{mg}/\text{mL}$  gegeben, um eine mögliche Limitierung der Proteinbindekapazität der Nitrocellulosemembran zu untersuchen. Sowohl die VEGF-haltigen FCS-Proben als auch reine FCS-Proben gleicher Konzentration wurden auf den Microarray gespottet. Zum anderen wurde VEGF in verschiedenen Konzentrationen zwischen 50 und 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zur einer 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FCS-Lösung gegeben und sowohl die VEGF-FCS-Gemische als auch die reinen VEGF-Lösungen auf den Microarray gespottet. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die Quantifizierung von VEGF in einer komplexen Probe möglich ist. Abbildung 5.14 zeigt die ermittelten Signalintensitäten in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration (links) und der VEGF-Konzentration (rechts).

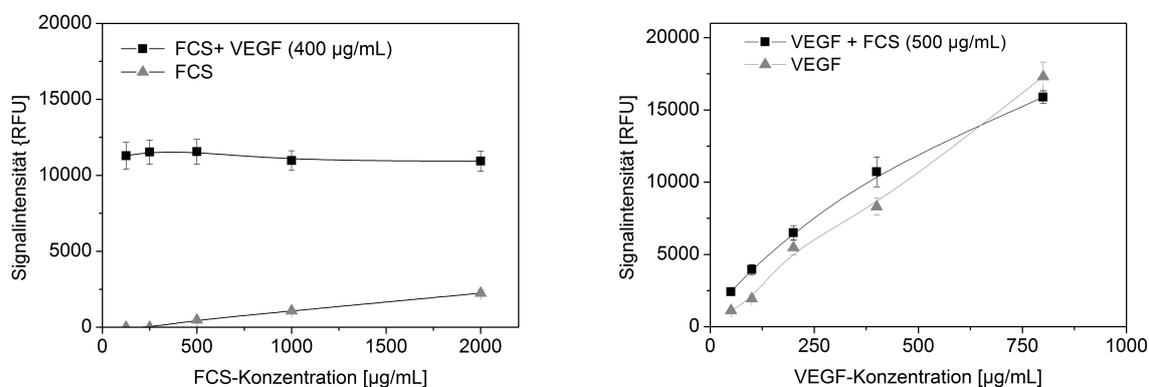


Abbildung 5.14: Detektion von VEGF in einem komplexen Proteingemisch aus FCS.

Es wird deutlich, dass das FCS in niedrigen Konzentrationen keine und in höheren Konzentrationen ab 0,5  $\text{mg}/\text{mL}$  nur geringe unspezifische Wechselwirkungen mit dem Detektionsaptamer V7t1 eingeht. Weiterhin wird das VEGF-Signal durch Anwesenheit des FCS nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass bis zu einer Gesamtproteinkonzentration von 2,4  $\text{mg}/\text{mL}$  und dem gewählten Spotting-Parameter von 8 Tropfen pro Spot die Beladungskapazität der Nitrocellulosemembran noch nicht erreicht ist. Es ist somit theoretisch möglich, auch höher konzentrierte Lösungen zu analysieren.

Wie Abbildung 5.14 rechts zeigt, ist die Detektion von VEGF in der komplexen Probe möglich. Die Signalintensität der VEGF-FCS-Probe unterscheidet sich nur unwesentlich von der des reinen VE-

GF und beide zeigen einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen Signalintensität und VEGF-Konzentration. Anhand einer Kalibrationskurve könnte somit die VEGF-Konzentration in einer unbekanntem FCS-Probe ermittelt werden.

### VEGF-Detektion in Zelllysaten

Nachdem die Detektion von VEGF in FCS-Lösungen erfolgreich getestet wurde, wurde das oben beschriebene Experiment mit einem Gemisch aus VEGF und Zelllysat durchgeführt. Im Vergleich zum FCS ist die Komplexität des Zelllysats höher, da es eine größere Vielfalt an Proteinen beinhaltet und diverse DNA- und RNA-Moleküle enthält. Das Zelllysat wurde durch Kultivierung des plasmidfreien *E. coli*-Stamms BL21(DE3) und anschließendem Zellaufschluss per Ultraschall gewonnen. Das LySAT wurde auf Gesamtproteinkonzentrationen von 0,16 bis 2,5 mg/mL verdünnt und mit VEGF in einer Endkonzentration von 400 µg/mL versetzt. Wie Abbildung 5.15 links verdeutlicht, wird das LySAT unspezifisch vom Detektionsaptamer V7t1 gebunden. Dabei ist die Signalintensität des reinen Zelllysats nahezu konzentrationsunabhängig höher als das des mit VEGF supplementierten Lysats. Ähnlich wie die in Abschnitt 5.1 beschriebenen unspezifischen Bindungen gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin sind diese falsch-positiven Signale vermutlich auf elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen LySATbestandteilen, z. B. mit basischen Proteinen zurückzuführen.

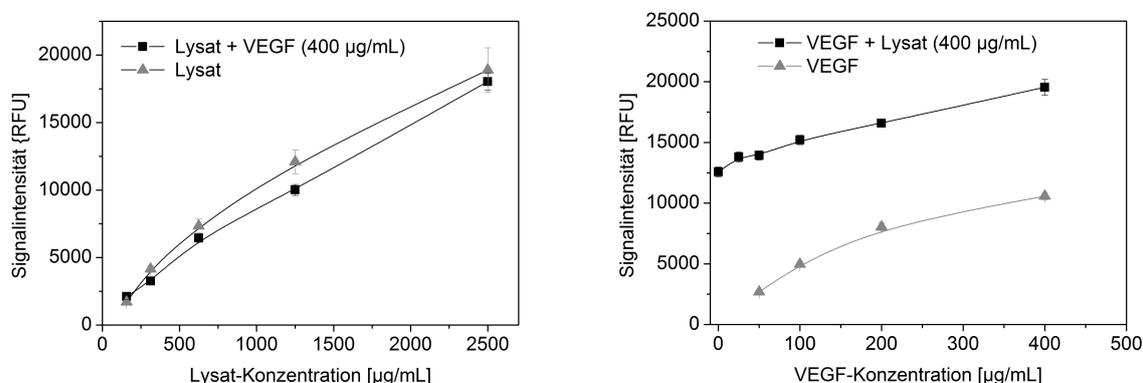
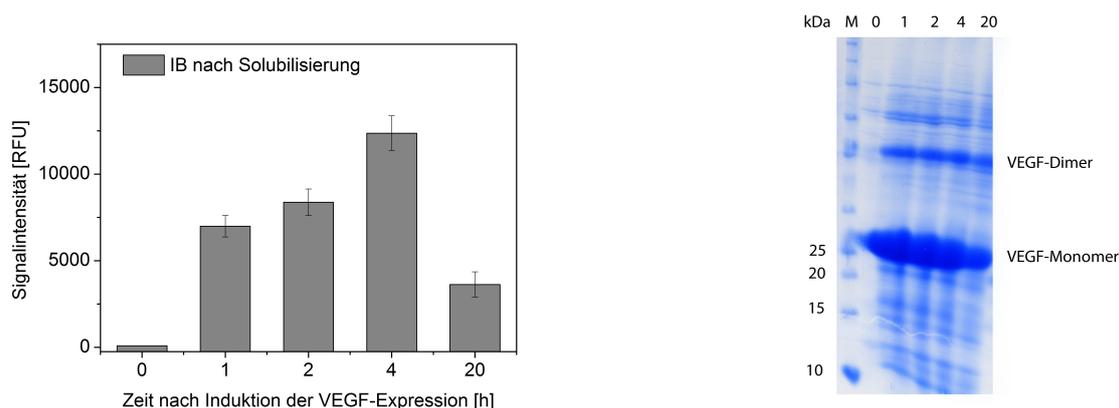


Abbildung 5.15: Detektion von VEGF in einem komplexen Proteingemisch aus Zelllysat.

Im zweiten Teil des Experiments wurde das auf 400 µg/mL verdünnte Zelllysat mit VEGF in verschiedenen Konzentrationen versetzt und die Signalintensität mit der des reinen VEGF gleicher Konzentration verglichen. Abbildung 5.15 rechts stellt die Signalintensitäten in Abhängigkeit von der VEGF-Konzentration dar. Sowohl für die komplexe Proteinprobe als auch für das freie VEGF war ein nahezu linearer Zusammenhang zu beobachten, wobei die Signalintensität des VEGF im LySAT durchschnittlich um 10.000 relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) höher war als die des reinen VEGF. Aufgrund dieses hohen Hintergrundsignals ist die Detektion des VEGF im Zelllysat unter der Voraussetzung

möglich, dass die sonstige Zusammensetzung des Lysats konstant bleibt und eine entsprechende Negativkontrolle berücksichtigt wird. Dennoch entsteht schon durch kleine Ungenauigkeiten, wie z.B. in der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, ein vergleichsweise großer Messfehler. Zur Detektion des VEGF aus Zellysat ist der entwickelte Assay daher nur bedingt geeignet.

Das im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellte VEGF wurde wie in Kapitel 3 beschrieben während der Produktion in *E. coli* Einschlusskörperchen eingelagert. Zur Isolation des VEGF wurden die Proteinaggregate solubilisiert wobei der entstehende *Inclusion-Bodies*-Rohextrakt weniger Fremdprotein enthält als das Zellysat. Es wurde getestet, ob es möglich ist, die Produktion des VEGF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Proteinexpression mit Hilfe des *Reverse Phase* Microarrays zu überwachen. Hierzu wurde der *E. coli* BL21(DE3)-Stamm mit pET16b-VEGF-His-Plasmid kultiviert, die VEGF-Expression mit IPTG induziert und vor der Induktion sowie zu mehreren Zeitpunkten nach der Induktion etwas Zellsuspension entnommen. Die Zellen wurden aufgeschlossen, der *Inclusion-Bodies*-Rohextrakt isoliert und solubilisiert. Die Proben wurden anschließend per SDS-PAGE und per *Reverse Phase* Microarray analysiert. Die Microarray-Analysen zeigen einen deutlichen Anstieg der Signalintensität in Folge der Induktion der Proteinexpression (dargestellt in Abbildung 5.16). Das Signal steigt bis 4 Stunden nach Induktion der Expression an und sinkt bei 20 h wieder ab. Dieses Ergebnis wird durch das Bandenmuster im Proteingel gestützt. Auch hier ist in der Ausgangsprobe kaum Protein detektierbar, in den Proben zwischen 1 h und 4 h nach Induktion der Expression ist eine starke VEGF-Bande sichtbar, die in der 20 h Probe noch deutlich vorhanden ist, jedoch an Intensität verloren hat. Diese Resultate zeigen, dass die Beobachtung der VEGF-Produktion im *Inclusion-Bodies*-Solubilisat mit Hilfe des *Reverse Phase* Microarrays möglich ist.



**Abbildung 5.16:** Detektion der VEGF-Produktion per *Reverse Phase* Microarray und SDS-PAGE.

Hiermit zeigt sich ein mögliches Einsatzgebiet für das *Reverse Phase* Microarray-Format. Im Gegensatz zur Analytik, wo eine hohe Sensitivität des Assays notwendig ist, werden in der rekombinanten Proteinproduktion hohe Proteinkonzentrationen erzielt. Aufgrund der hohen Beladungskapazität der

Nitrocellulosemembran ist es mit Hilfe eines *Reverse Phase* Microarrays möglich diese Proben zu untersuchen ohne sie verdünnen zu müssen, während sich sensitivere Assay-Formate wie z. B. ein ELISA bereits in der Sättigung befinden würden. Weiterhin ist es denkbar, den anschließenden Aufreinigungsprozess per *Reverse Phase* Microarray zu überwachen.

### Zusammenfassung

Unter Verwendung des Cy3-markierten Detektionsaptamers V7t1 wurde ein Detektions-Assays im *Reverse Phase* Microarray-Format zum Nachweis von VEGF entwickelt. Der optimierte Assay ermöglicht die Detektion von VEGF mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/mL (1,1 µM) und einem dynamischen Bereich bis mindestens 800 µg/mL (17,5 µM). Er wurde erfolgreich zur Detektion von VEGF in einer komplexen FCS-Probe und in *Inclusion-Bodies*-Solubilisaten eingesetzt. Die unspezifischen Bindungen an α-Chymotrypsin sowie Bestandteilen des *E. coli*-Zelllysats hingegen zeigen die Grenzen des *Reverse Phase* Microarrays auf: Sie sind möglicherweise auf die hohe effektive Konzentration des Proteins in den Spots zurückzuführen, die unspezifische Interaktionen begünstigt [50]. Weiterhin ist die Sensitivität des Assays mit einem Detektionslimit von 50 µg/mL im Vergleich zu einem Detektionslimit von ca. 2,5 µg/mL, das bereits mit einem Aptamer-basierten *Sandwich* Assay erzielt wurde [74], relativ gering. Dies ist auf die unterschiedlichen Assay-Formate zurückzuführen, da das Targetprotein im *Sandwich* Microarray im Spot aufkonzentriert wird.

## 5.2 Entwicklung eines *Sandwich* Aptamer-Microarrays

Im Rahmen eines *Sandwich* Assays wird das Targetprotein durch ein Fängeraptamer gebunden, das direkt auf dem Glasobjektträger immobilisiert ist, so dass keine Nitrocellulose-beschichteten Oberflächen benötigt werden. Nach Inkubation der Proteinlösung erfolgt die Detektion mittels eines zweiten VEGF-bindenden Aptamers mit Fluoreszenzmarkierung. Durch die doppelte Protein-Aptamer-Interaktion ist die Selektivität eines *Sandwich* Microarrays größer als die eines *Reverse Phase* Assays [156], so dass die Gefahr falsch-positiver Signale reduziert wird. Weiterhin wird das Targetprotein durch Bindung an das Fängeraptamer aufkonzentriert, so dass ein geringeres Detektionslimit zu erwarten ist. Daher wurde er als alternative Detektionsmethode zum Nachweis von VEGF im Microarray-Format getestet, wobei zwei verschiedene Experimentabläufe verglichen wurden, die schematisch in Abbildung 5.17 dargestellt sind.

Im klassischen Ablauf eines *Sandwich* Assays (dargestellt in Abbildung 5.17 A) wird der mit dem Fängeraptamer modifizierte Slide in zwei Schritten zunächst mit dem Targetprotein und anschließend mit dem Detektionsaptamer inkubiert. Als Alternative wurde die Präinkubation des Targetproteins und des Detektionsaptamers getestet (Abbildung 5.17 B). Hier werden zunächst das Targetprotein

und das Detektionsaptamer im Reaktionsgefäß gemischt und erst im Anschluss mit dem Microarray-Slide inkubiert. Falls die Aptamer-Protein-Bindung an der Microarray-Oberfläche sterisch gehindert ist, kann dieses Format die Detektion des Targetproteins positiv beeinflussen, da eine der Aptamer-Protein-Bindungen in Lösung stattfindet.

Zur Entwicklung eines *Sandwich* Assays ist zunächst die Auswahl geeigneter Aptamere als Fänger- und Detektionsmoleküle notwendig. Hier wurden die bereits für den *Reverse Phase* Microarray eingesetzten VEGF-bindenden Aptamere getestet. Bei der Wahl der Oberfläche und der Methode zur Immobilisierung des Fängeraptamers wurde darauf geachtet, die Aptamerfaltung und in Folge dessen die VEGF-Bindung des Aptamers nach der Immobilisierung in möglichst geringem Maße zu beeinträchtigen. Weiterhin wurden verschiedene Bedingungen wie Pufferzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -zeit während des Blockierens der Glasoberfläche sowie der Protein- und Aptamerinkubation getestet und die Scan-Parameter zur Detektion des Fluoreszenzsignals angepasst.

### 5.2.1 Auswahl geeigneter Microarray-Oberflächen und Aptamere

Die Immobilisierung der VEGF-bindenden Aptamere auf dem Microarray soll über eine terminale Aminogruppe erfolgen, die es erlaubt, die Ausrichtung des Aptamers auf der Glasoberfläche zu kontrollieren und somit die Aptamerfaltung in möglichst geringem Maße zu beeinflussen. Dennoch kann durch sterische Hinderung an der festen Oberfläche die molekulare Flexibilität des Aptamers eingeschränkt und somit die Aptamerfaltung in ihre typische dreidimensionale Konformation behindert werden. In diesem Fall wird die Erkennung und Bindung des Targetproteins inhibiert. Durch Einsatz von Spacern zwischen Aptamer und Oberfläche können mögliche sterische Hinderungen reduziert werden, da die Spacer wie ein flexibler Arm den Abstand zwischen Aptamer und Oberfläche vergrößern. Die Spacer-Moleküle können entweder während der Oligonukleotidsynthese zwischen die Aptamersequenz und die terminale Aminogruppe eingebracht werden, oder durch chemische Modifizierung der Glasoberfläche auf dieser verankert werden. Zur Entwicklung des *Sandwich* Microarrays wurden 3D-Aldehyd-Slides (PolyAn GmbH, Berlin) verwendet. Hierbei handelt es sich um Glasobjektträger, die mit einer dreidimensionalen Matrix aus langkettigen Polymeren beschichtet sind, die als Spacer-Moleküle dienen. Die Polymere sind kovalent mit der Glasoberfläche verbunden und bilden wie in Abbildung 5.18 dargestellt eine baumartige Struktur mit Ästen aus Aldehydgruppen. Die Distanz zwischen Glasoberfläche und Aldehydgruppen beträgt laut Herstellerangaben bis zu 50 nm.

Die Aldehydgruppen ermöglichen die direkte Immobilisierung von aminomodifizierten Aptameren in einem Reaktionsschritt. Bei der Wahl von Aptameren zum Einsatz im *Sandwich* Microarray-Assay wurde auf die bereits im *Reverse Phase* Format getesteten VEGF-bindenden Aptamere V7t1, Del5-1, SL2B und 33t5 zurückgegriffen. Prinzipiell sind zwei Aptamere notwendig, die das Zielmolekül mit möglichst hoher Spezifität und Affinität binden und gegen unterschiedliche Aptatope des Targets ge-

richtet sind, damit sie das Molekül gleichzeitig binden können. Daher bietet sich die Kombination des Aptamers V7t1, das gegen die Rezeptorbindedomäne des VEGF gerichtet ist, mit einem der Aptamere Del5-1 oder SL2B an, die an die Heparinbindedomäne binden. Des Weiteren wurde das V7t1 in Kombination mit 33t5 getestet, dessen Binderegion noch nicht zweifelsfrei identifiziert wurde.

Da es sich beim VEGF um ein homodimeres Protein handelt, ist es darüber hinaus ebenfalls möglich das Protein mit zwei identischen Aptamern zu binden. Aufgrund der antiparallelen Anordnung der VEGF-Monomere liegen die Aptatope dabei an gegenüberliegenden Seiten des Moleküls, so dass sterische Hinderungen unwahrscheinlich sind.

### 5.2.2 Immobilisierung des Fängeraptamers

Die Immobilisierung der Fängeraptamere erfolgte nach dem in Abbildung 5.19 dargestellten Reaktionsschema. Die aminomodifizierten Aptamere wurden in PBS verdünnt und mit dem GeSiM Nanoplotter kontaktlos mit 6 Tropfen pro Spot, bei einer Spannung von 75 V und einer Frequenz von  $100\text{ s}^{-1}$  auf den Slide gespotet, so dass sie in Kontakt mit den Aldehydgruppen auf der Glasoberfläche traten. Die Immobilisierungsreaktion beginnt mit einem nukleophilen Angriff der terminalen Aminogruppe des Aptamers auf das Carbonylkohlenstoffatom der Aldehydgruppe. Das entstehende Halbamin stabilisiert sich durch Abspaltung von Wasser zum Imin. Dabei wird das Gleichgewicht der Reaktion durch Entfernung von Wasser beim Eintrocknen der Spots auf die Seite der Produkte verschoben. In einem zweiten Reaktionsschritt wurden die nicht abreagierten Aldehydgruppen mit TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol) geblockt. Die Reaktion verläuft nach dem selben Mechanismus wie die Aptamerimmobilisierung und wurde über 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Um den Erfolg der Aptamerimmobilisierung zu überprüfen, wurden die Aptamere mit SYBR Green II angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der einzelsträngige DNA bindet. Abbildung 5.19 rechts zeigt einen Ausschnitt des Microarray-Scans nach SYBR Green II Färbung. Es wurden die VEGF-bindenden Aptamere V7t1 und Del5-1, das Kontrollaptamer 266 und reine Pufferlösung ohne Aptamer gespotet. Die Aptamerspots zeigten im Gegensatz zur Pufferlösung deutlich erkennbare Fluoreszenzsignale, deren Intensitäten je nach Aptamer variierten. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Anfärbung der verschiedenen Aptamerstrukturen zurückzuführen. Weiterhin ist es möglich, dass die Aptamere in unterschiedlicher Effizienz auf den Slide immobilisiert wurden.

### 5.2.3 Blockierung der Glasoberfläche

Da das VEGF wie viele andere Proteine an Glasoberflächen adsorbiert und somit für ein hohes Hintergrundsignal sorgen würde, wurden die Objektträger vor Durchführung des Microarray-Experiments in einer Proteinlösung inkubiert, um die freien Bindungsplätze zu besetzen. Hierzu wird vielfach das

Protein BSA eingesetzt, das im Rahmen dieses Assays jedoch die VEGF-Adsorption nicht komplett unterbinden konnte. Das Milchprotein  $\beta$ -Casein wird wie das BSA als „weiches“ Protein klassifiziert, das eine instabile Proteinstruktur besitzt und in Folge dessen dazu neigt, an jegliche Oberflächen zu adsorbieren [169]. Caseine wurden daher als alternatives Blockreagenz getestet. Weiterhin wurde der Einfluss des Blockpuffers und der Temperatur während des Prozesses untersucht. Hierzu wurden unmodifizierte Microarray-Slides in eine Inkubationskammer eingespannt und jeder hierdurch entstehende Subarray wurde bei unterschiedlichen Bedingungen geblockt. Anschließend wurden die Slides zunächst für 2 h mit VEGF dann für 2 h mit dem fluoreszenzmarkierten Aptamer V7t1 inkubiert und bei einer Wellenlänge von 532 nm gescannt. Das durchschnittliche Hintergrundsignal wurde für jede Bedingung aus dem mittleren Hintergrundsignal an je zehn zufällig ausgewählten Flächen des Slides bestimmt.

Abbildung 5.20 zeigt drei Ausschnitte des Scans eines Glasobjektträgers nach Inkubation mit VEGF und V7t1. Sie zeigen je einen Subarray der entweder nicht geblockt, mit BSA geblockt oder mit Casein geblockt wurde. Das Hintergrundsignal wird durch den Blockingvorgang stark reduziert, wobei sich Casein deutlich besser als Blockreagenz eignet als BSA. Dies wird zusätzlich durch Abbildung 5.21 verdeutlicht, die die Signalintensität des Hintergrunds in Abhängigkeit von den Blockbedingungen darstellt. Durch Blockieren mit BSA wurde das Hintergrundsignal je nach verwendetem Puffer auf 27 %–43 % reduziert, durch Blockieren mit Casein auf 4 %–7 %. Der verwendete Puffer hat nur einen geringen Einfluss auf die Effizienz des Blockvorgangs, wobei PBS (pH 7,4) und TBSET-Puffer (pH 7,0) besser geeignet sind als SBB (pH 9,0). Weiterhin wird deutlich, dass durch Erhöhung der Blockingtemperatur auf 30 °C das Hintergrundsignal nochmals reduziert wurde. Der Einfluss der Inkubationsdauer im Blockpuffer wurde nicht untersucht, der Vorgang wurde standardmäßig über Nacht durchgeführt. Für die folgenden Versuche wurde TBSET als Blockpuffer verwendet, da somit das Absättigen der Glasoberfläche und das Blockieren nicht abreagierter Aldehydgruppen zu einem Schritt zusammengefasst werden konnte.

### 5.2.4 Entwicklung des Detektions-Assays

#### Nachweis der VEGF-Bindung

In einem ersten *Sandwich* Microarray-Experiment wurde das VEGF-bindende Aptamer V7t1 und als Negativkontrolle das Aptamer 266 auf einen Microarray-Slide immobilisiert. Anschließend wurden sie in verschiedenen Subarrays mit VEGF, Myoglobin oder reiner Pufferlösung inkubiert und im nachfolgenden Detektionsschritt mit dem Cy3-markierten Aptamer Del5-1 inkubiert. Der Slide wurde bei 532 nm Wellenlänge und 100 % Laserintensität gescannt und die Signalintensitäten der einzelnen Spots wurden berechnet. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 5.22 dargestellt. Mit dem Fängeraptamer V7t1 war es möglich, das VEGF auf der Microarray-Oberfläche zu binden

und mit dem Detektionsaptamer Del5-1 wurde das Protein erfolgreich detektiert. Die Aptamerkombination aus V7t1 und Del5-1 zeigte jedoch auch unspezifische Bindungen gegenüber dem Kontrollprotein Myoglobin, wobei die Signalintensität ca. 63 % des VEGF-Signals betrug. Weiterhin waren Wechselwirkungen zwischen Fängeraptamer und Detektionsaptamer (Signalintensität ca. 25 % des VEGF-Signals) nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte das Fängeraptamer 266 weder eine Bindung an VEGF oder Myoglobin noch Wechselwirkungen mit dem Detektionsaptamer Del5-1. Die spezifische VEGF Bindung in *Sandwich* Microarray-Assay wurde somit prinzipiell nachgewiesen, wobei ebenfalls deutlich wurde, dass der Assay genauer charakterisiert und optimiert werden muss.

### Vergleich der Experimentabläufe

Während der Durchführung der *Sandwich* Microarray-Experimente wurde festgestellt, dass das VEGF nicht nur an die immobilisierten Aptamere sondern trotz Blockierung des Slides mit Casein auch an die Glasoberfläche bindet, was in einem erhöhten Hintergrundsignal resultierte. Um dies zu verhindern, wurden dem Bindepuffer während der Proteininkubation BSA oder Ammoniumsulfat in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. BSA soll als Trägerprotein die Stabilität des VEGF in Lösung erhöhen. Ammoniumsulfat kann als kosmotropes Salz in niedrigen Konzentrationen die Löslichkeit der Proteine erhöhen [170]. Weiterhin wurden die in Abbildung 5.17 vorgestellten Vorgehensweisen zur Durchführung eines *Sandwich* Microarray-Assays verglichen. Dazu wurde ein Experiment im klassischen zweistufigen *Sandwich* Assay durchgeführt, bei dem die Protein- und die Detektionsaptamerlösung in zwei Schritten nacheinander mit dem Slide inkubiert wurden. Unter gleichen Bedingungen wurde ein zweites Experiment durchgeführt, in dem Protein und Detektionsaptamer zunächst im Reaktionsgefäß gemischt und anschließend gemeinsam auf dem Slide inkubiert wurden. Abbildung 5.23 stellt die Signalintensität und die SNR als Maß für die Signalqualität der VEGF-Spots in Abhängigkeit zum Bindepuffer dar. Der Zusatz von BSA zum Bindepuffer erhöhte die Signalintensität leicht, wobei in nachfolgenden Experimenten geklärt werden müsste, ob es sich hierbei möglicherweise um unspezifische Bindungen der Aptamere mit BSA handelt. Die Adsorption des VEGF an die Glasoberfläche wurde nicht inhibiert, so dass die SNR sich durch Anwesenheit des BSA kaum veränderte. Der Zusatz von Ammoniumsulfat zum Bindepuffer hingegen steigerte sich die SNR insbesondere im Präinkubations-Assay signifikant gegenüber der Vergleichsprobe obwohl gleichzeitig die Signalintensität abnahm. Das Ammoniumsulfat inhibierte somit nicht nur die Wechselwirkungen zwischen VEGF und Glasoberfläche sondern auch die Aptamer-VEGF-Bindung. Aufgrund der verbesserten Signalqualität wurden die folgenden Experimente als Präinkubationsassay durchgeführt. Zusätzlich bietet der Zusatz geringer Mengen Ammoniumsulfat zum Bindepuffer in einer Konzentration von maximal 50 mM möglicherweise einen Ansatz, die Signalqualität weiter zu verbessern. Dieser wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiterverfolgt.

### Vergleich verschiedener Detektionsaptamere

Für die Funktion eines Detektions-Assays im *Sandwich* Format sind zwei kompatible Aptamere notwendig, die das Targetprotein an unterschiedlichen Regionen und im Idealfall von sich gegenüberliegenden Seiten aus binden. In den vorhergehenden Versuchen wurde ein *Sandwich* Microarray-Experiment mit dem Fängeraptamer V7t1 und dem Detektionsaptamer Del5-1 erfolgreich durchgeführt. Im folgenden Experiment sollen beide Aptamere als Fängeraptamere in Kombination mit den anderen VEGF-bindenden Aptameren untersucht werden.

Wie Abbildung 5.24 verdeutlicht, ist das Aptamer V7t1 als Fängeraptamer mit allen anderen anti-VEGF-Aptameren als Detektionsaptamer kompatibel. Lediglich in Kombination mit der Kontrollsequenz 266 wurde kein Signal detektiert. In Kombination mit SL2B, Del5-1, 33t5 und auch dem V7t1 war es möglich, das VEGF zu detektieren, wobei die höchste Signalintensität mit SL2B als Detektionsaptamer erzielt wurde. Die erfolgreiche VEGF-Detektion mit V7t1 als Fänger- und Detektionsaptamer ist mit der Struktur des VEGF erklärbar. Das Protein bildet ein Homodimer, wobei das V7t1 vermutlich nur die Rezeptorbindedomäne eines Monomers bindet, so dass ein zweites Cy3-markiertes V7t1-Aptamer das andere Monomer binden kann.

Im Gegensatz zum V7t1 ist das Del5-1 lediglich mit dem Detektionsaptamer V7t1 kompatibel. Das Del5-1 bindet genau wie das SL2B an die Heparinbindedomäne des VEGF und verhindert möglicherweise, dass dort ein weiteres Aptamer binden kann. Da das Aptamer 33t5 mit dem V7t1, nicht aber mit dem Del5-1 kompatibel ist, ist zu vermuten, dass es ebenfalls gegen die Heparinbindedomäne des VEGF gerichtet ist.

Unabhängig von der Aptamerkombination ist zu beobachten, dass alle *Sandwich*-Microarray-Experimente, die eine VEGF-Detektion erlauben, gleichzeitig unspezifische Wechselwirkungen gegenüber Myoglobin zeigen. Dabei beträgt die Signalintensität der Myoglobin-Proben je nach Aptamer zwischen 10 % und 48 % der des VEGF-Signals. Diese unspezifischen Bindungen werden im folgenden Abschnitt genauer untersucht.

### Untersuchung unspezifischer Bindungen

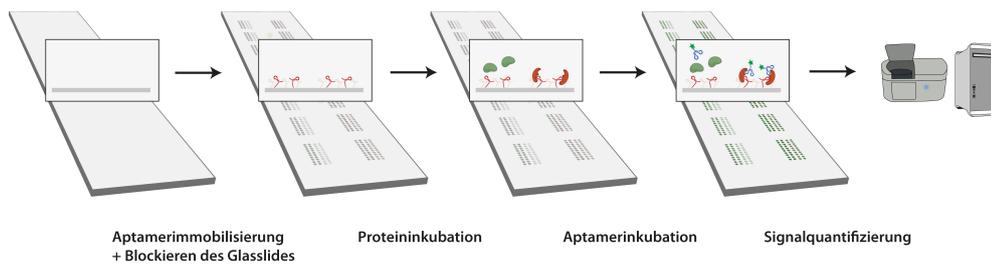
Der Präinkubationsassay (Abbildung 5.17) wurde auf unspezifische Bindungen gegenüber Casein,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Myoglobin und BSA untersucht. Hierzu wurde jeweils eine 50 nM VEGF-Lösung mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M Kontrollprotein versetzt und im *Sandwich* Assay mit dem Fängeraptamer V7t1 und dem Detektionsaptamer SL2B inkubiert. Weiterhin wurde die gleiche Menge Kontrollprotein im Bindepuffer ohne VEGF gelöst und ebenfalls per *Sandwich* Microarray-Assay analysiert. Wie das Balkendiagramm in Abbildung 5.25 zeigt, sind im Gegensatz zum klassischen Microarray-Ablauf (Abbildung 5.22) kaum unspezifische Bindungen an die Negativkontrollproteine

vorhanden, obwohl diese in deutlichem Überschuss vorliegen. Dennoch beträgt die Signalintensität in allen VEGF-freien Proben unabhängig vom Protein im Bindepuffer ca. 1500 RFU, was ca. 30 % des höchsten VEGF-Signals entspricht. Dieses Signal entsteht vermutlich durch Wechselwirkungen zwischen Fänger- und Detektionsaptamer. Es ist zu vermuten, dass auch die detektierten Signale der Myoglobinproben im vorhergehenden Experiment auf diese Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Weiterhin wird deutlich, dass die Kontrollproteine zwar keine unspezifischen Signale im Assay hervorrufen, jedoch die Bindung des VEGF an die Aptamere stören. Besonders effektiv inhibierte das  $\alpha$ -Chymotrypsin die Bindung des VEGF, so dass die Signalintensität abzüglich des Puffersignals um 96 % sank. Dies lässt darauf schließen, dass die Kontrollproteine entweder mit dem Fängeraptamer V7t1 oder dem Detektionsaptamer SL2B, nicht aber mit beiden Aptameren gleichzeitig interagieren. Entsprechende Wechselwirkungen des  $\alpha$ -Chymotrypsin mit verschiedenen Aptameren wurden bereits im *Reverse Phase* Microarray Format beobachtet (Abbildung 5.12). Weiterhin sind auch Wechselwirkungen mit dem VEGF denkbar.

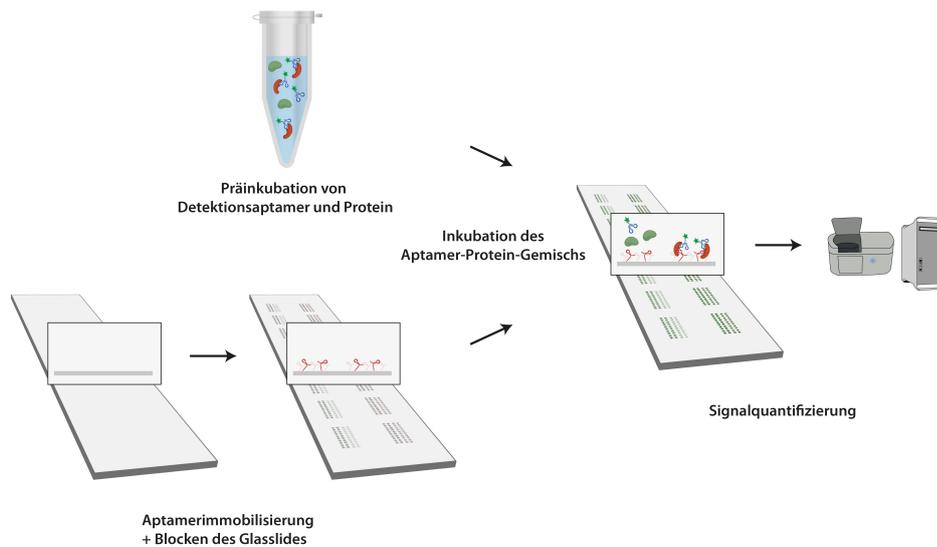
### Zusammenfassung

Der Aufbau eines *Sandwich* Assays zur Proteindetektion ist aufgrund einer Vielzahl zu berücksichtigender Parameter deutlich komplexer und zeitaufwändiger als der eines *Reverse Phase* Microarrays. Trotz unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Fänger- und Detektionsaptamer oder der Störung der Aptamerbindung zum Targetprotein durch andere basische Proteine wie das  $\alpha$ -Chymotrypsin, konnte gezeigt werden, dass ein *Sandwich* Microarray-Assay unter Verwendung der ausgewählten VEGF-bindenden Aptamere durchführbar ist. Dabei wurden in den bisherigen Experimenten nur geringe unspezifische Signale durch Bindungen von Nicht-Targetproteinen detektiert. Jedoch können insbesondere basische Proteine die Detektion des VEGF behindern. Die Versuche zur Charakterisierung des Assays wurden mit VEGF-Konzentrationen von 50–200 nM durchgeführt, was einer Massenkonzentration von 2,25–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  entspricht. Somit ist das bereits erzielte Detektionslimit mindestens 20-mal niedriger als das Detektionslimit des optimierten *Reverse Phase* Assays. Nach Optimierung des *Sandwich* Assays ist eine weiter verringerte Nachweisgrenze zu erwarten. Insbesondere diese Sensitivität macht ihn zu einer vielversprechenden Alternative zum *Reverse Phase* Detektions-Assay für die analytischer Anwendung.

**A Ablauf eines klassischen *Sandwich* Microarray-Experiments**



**B Ablauf eines *Sandwich* Microarray-Experiments mit Präinkubation**



**Abbildung 5.17:** Abläufe der Microarray-Experimente im *Sandwich* Format.

A: Im klassischen Experimentablauf wird der Aptamer-modifizierte Microarray zunächst mit der Protein- dann mit der Detektionsaptamerlösung inkubiert. Anschließend wird das Fluoreszenzsignal quantifiziert. B: Im Präinkubations-Assay wird das Protein zunächst mit dem Detektionsaptamer inkubiert und das Aptamer-Protein-Gemisch anschließend auf den Aptamer-modifizierten Microarray aufgetragen. Im Anschluss wird das Fluoreszenzsignal quantifiziert.

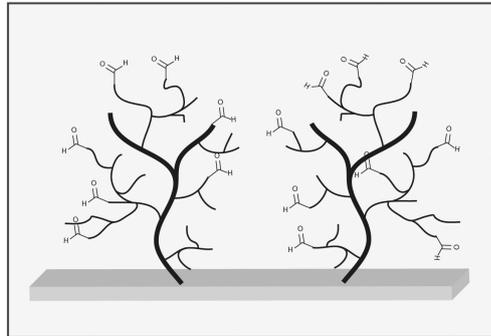
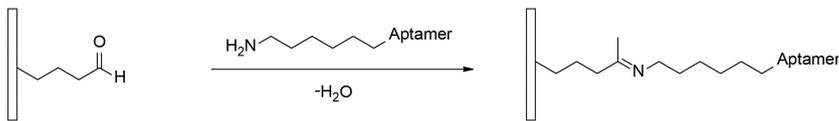


Abbildung 5.18: Oberflächenmodifikation der verwendeten 3D-Aldehyd Microarray-Substrate.

I: Aptamerimmobilisierung



II: Blocken nicht-abreagierter Aldehydgruppen

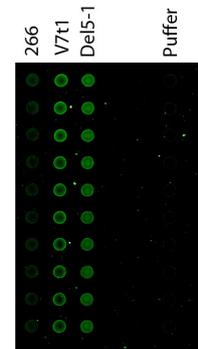
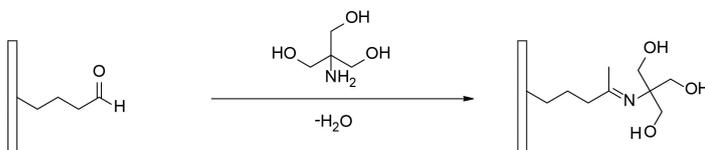
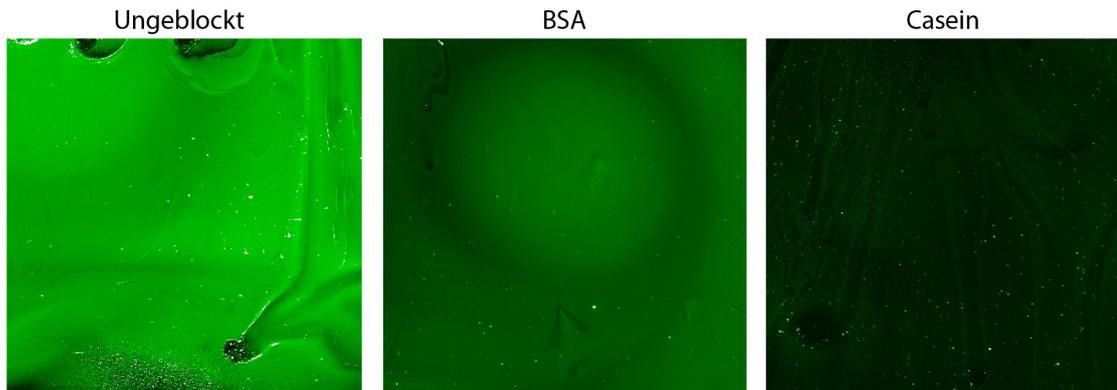
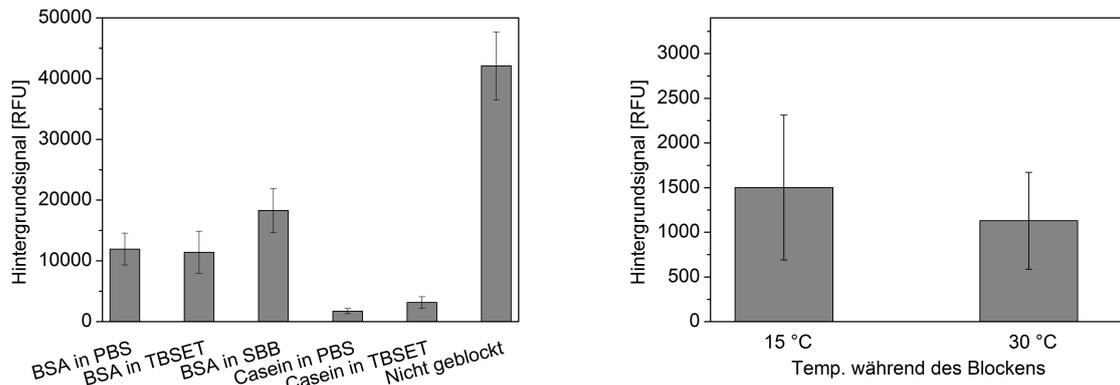


Abbildung 5.19: Reaktionsschema und Nachweis der Aptamerimmobilisierung durch Färbung mit SYBR Green II.

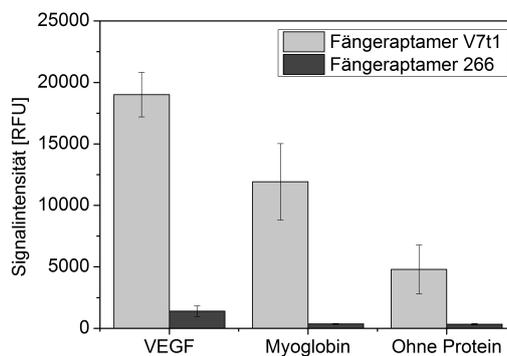
Links: Das Reaktionsschema zeigt im ersten Schritt die Immobilisierung aminomodifizierter Aptamere auf Aldehyd-Microarrays. Im zweiten Reaktionsschritt werden die nicht-abreagierten Aldehydgruppen mit TRIS blockiert. Rechts: Die Aptamere wurden in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  unter Standard-Spotting-Bedingungen (siehe Anhang B.7.2) auf den Slide gespottet. Die Färbung der einzelsträngigen DNA erfolgte mit SYBR Green II, die Detektion bei 532 nm Wellenlänge und einer Laserintensität von 100 %.



**Abbildung 5.20:** VEGF-Hintergrundsignal eines ungeblockten, mit BSA geblockten und mit Casein geblockten Slides. Die Slides wurden nach dem Blockieren erst mit 50 nM VEGF dann mit 50 nM V7t1 inkubiert. Die Ausschnitte stammen aus dem gleichen Scan bei identischen Kontrast- und Helligkeitseinstellungen.



**Abbildung 5.21:** Reduktion des Hintergrundsignals durch verschiedene Bedingungen während des Blockingvorgangs. Links: Die Blockierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Rechts: Die Blockierung erfolgte mit 0,5 % Casein in PBS.



**Abbildung 5.22:** Nachweis der Proteinbindung im *Sandwich* Microarray-Format mit dem Detektionsaptamer Del5-1. Die Inkubation erfolgte zunächst mit 100 nM VEGF oder Myoglobin in TBSET oder reinem TBSET (ohne Protein), die Detektion erfolgte mit je 100 nM Del5-1.

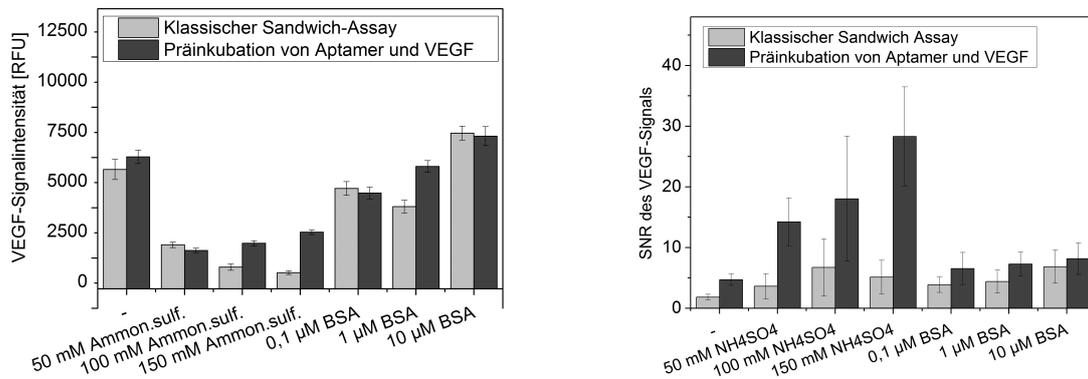


Abbildung 5.23: Einfluss des Inkubationspuffers und des Experimentablaufs auf die VEGF-Detektion im *Sandwich* Microarray-Format.

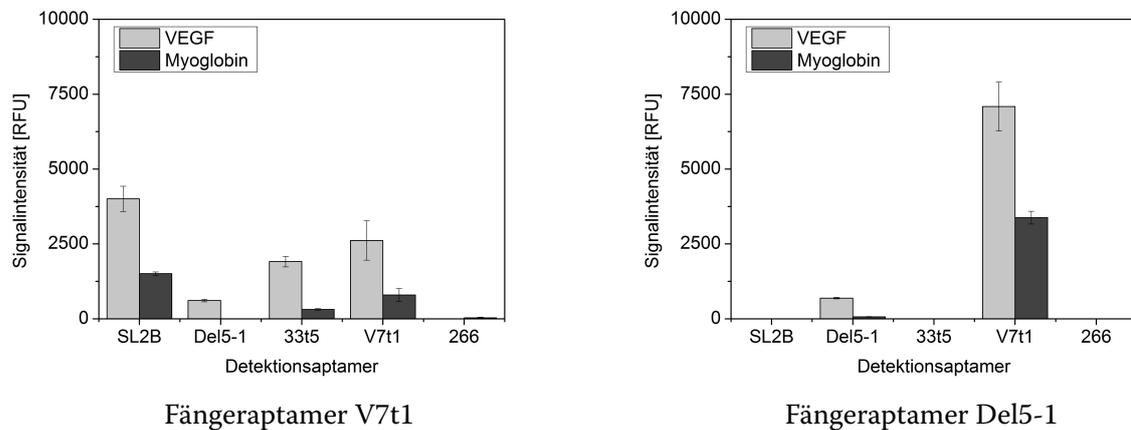


Abbildung 5.24: Untersuchung verschiedener Detektionsaptamere in Kombination mit dem Fängeraptamer V7t1 (links) und Del5-1 (rechts).

Es wurden jeweils 50 nM VEGF und Myoglobin eingesetzt, die Detektion erfolgte mit je 100 nM des Detektionsaptamers.

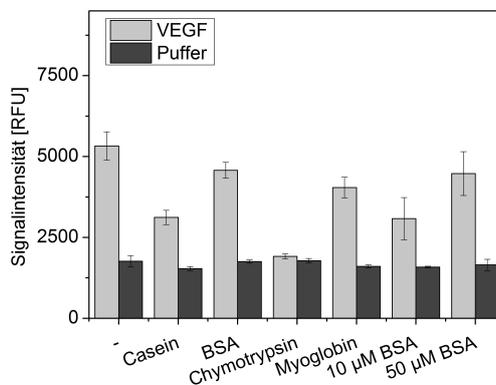
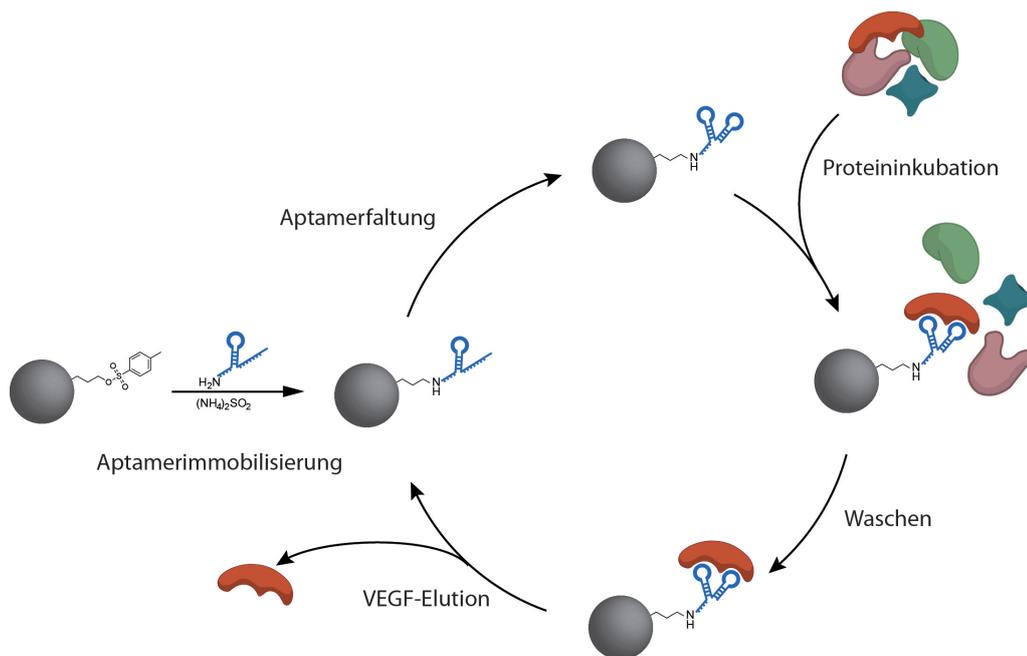


Abbildung 5.25: Nachweis unspezifischer Bindungen im Präinkubations-*Sandwich*-Microarray-Assay.

Es wurden jeweils 50 nM VEGF eingesetzt, die Detektion erfolgte mit 100 nM SL2B.

## 6 Entwicklung einer Aptamer-basierten Aufreinigungsstrategie

Wie im Abschnitt 5.2 beschrieben, wurden VEGF-bindende Aptamere erfolgreich auf Microarray-Oberflächen immobilisiert, wobei ihre VEGF-Bindeaktivität erhalten blieb. Die Immobilisierung der Aptamere wird im Folgenden auf oberflächenmodifizierte Magnetpartikel übertragen, um eine Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von VEGF herzustellen. Das Prinzip der Aptamerimmobilisierung und VEGF-Aufreinigung ist in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung der Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF.

Die Aptamere dienen als Affinitätsliganden zur Bindung von VEGF, die Magnetpartikel als festes Trägermaterial, das per magnetischer Separation von den Proteinen in der flüssigen Phase abgetrennt werden kann. Zur Herstellung der Affinitätsmatrix werden aminomodifizierte Aptamere eingesetzt und kovalent an die Magnetpartikeloberfläche gebunden. Die Aminogruppe befindet sich am 3'- oder 5'-Terminus des Oligonukleotids und ermöglicht es wie im Microarray-Assay, die Orientierung der immobilisierten Aptamere zu kontrollieren. Dies kann fehlerhafte Aptamerfaltungen verhindern, die

zu verminderter Bindeaktivität führen würden [61]. Ihre funktional-aktive dreidimensionale Konformation nehmen die immobilisierten Aptamere ein nachdem sie in den Aptamer-spezifischen Selektionspuffer gebracht werden. Sie werden anschließend mit einer VEGF-haltigen Lösung inkubiert und können ihr Targetprotein binden. Nach erneuter magnetischer Separation sowie mehreren Waschschrritten kann das gebundene VEGF durch Änderung der Pufferbedingungen eluiert werden. Dies kann durch Schwächung der Targetbindung oder durch Destabilisation der Aptamerfaltung erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Einzelschritte der Aptamer-basierten Aufreinigung des VEGF charakterisiert und optimiert, um ein möglichst effizientes Aufreinigungssystem zu entwickeln. Anschließend wurde die Anwendbarkeit des optimierten Systems zur Aufreinigung von VEGF aus komplexen Proteingemischen untersucht.

## 6.1 Bereitstellung der Affinitätsmatrix

### 6.1.1 Auswahl geeigneter Magnetpartikeloberflächen

Zur Entwicklung neuer Systeme zur Proteinaufreinigung im Labormaßstab eignen sich Magnetpartikel als stationäre Phase, da sie mit Standardkopplungsreaktionen individuell modifiziert werden können. Zusätzlich können sie mit einem Magnetständer einfach und effektiv von der flüssigen Phase separiert werden, so dass Aufreinigungsprozesse in kleinem Volumen von minimal 20 µL durchgeführt werden können. Magnetpartikel, die für die Aufreinigung von Proteinen verwendet werden, haben typischerweise einen Durchmesser von 0,1–10 µm wodurch sie im Vergleich zu ihrem Volumen eine große Oberfläche zur Immobilisierung von Affinitätsliganden bereitstellen. Ihr Aufbau ist in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt.

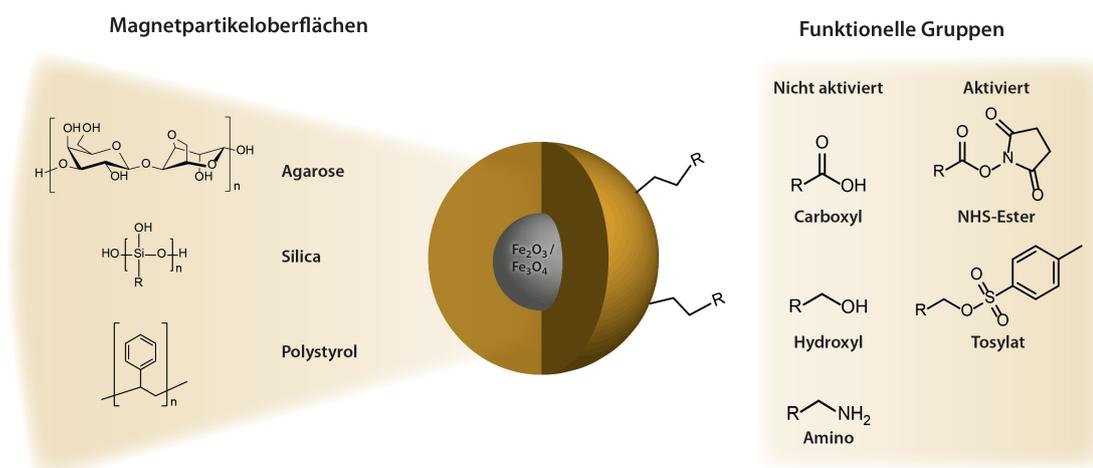
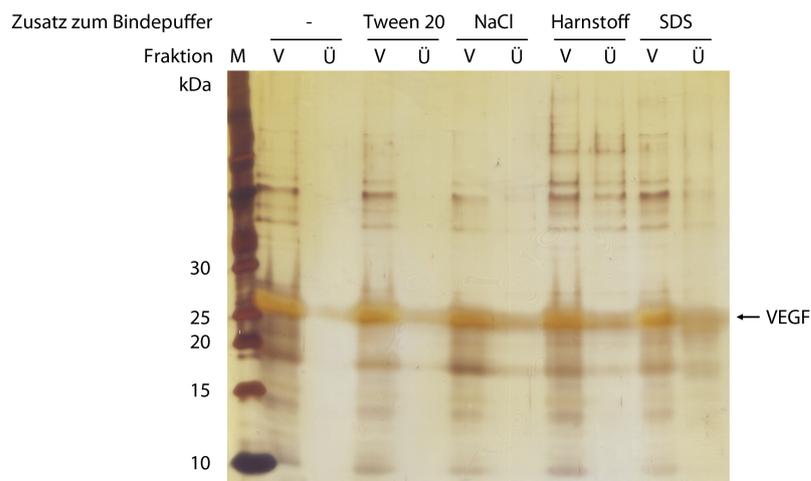


Abbildung 6.2: Aufbau und typische Oberflächenmaterialien von Magnetpartikeln.

Die Partikel besitzen einen super-paramagnetischen Kern, der aus einem Gemisch von Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) und Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )-Partikeln besteht. Die Eisenoxidpartikel sind in das Oberflächenpolymer eingebettet und zusätzlich mit einer eisenfreien Schicht aus Oberflächenpolymer überzogen. Je nach Hersteller und Partikeltyp werden unterschiedliche Oberflächenmaterialien eingesetzt, wobei häufig Agarose, Siliciumdioxid (Silica) oder Polystyrol verwendet werden. Um die Kopplung von Oligonukleotiden oder Proteinen zu ermöglichen, tragen die Oberflächenpolymere funktionelle Gruppen, wie Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen, teils in präaktivierter Form. Je nach Kombination von Oberflächenmaterial und funktioneller Gruppe unterscheiden sich die Magnetpartikel in ihren chemischen Eigenschaften, wie Hydrophobizität, Oberflächenladung oder Reaktivität.

Wie schon im Rahmen der Microarray-Experimente im *Sandwich*-Format (Abschnitt 5.2.3) gezeigt, neigt das VEGF zur irreversiblen Adsorption an Oberflächen. Dies würde während der Aufreinigung zu erheblichem Proteinverlust führen und soll daher unterbunden werden. Die Adsorption wird zum einen von den Proteineigenschaften zum anderen von der Beschaffenheit des Oberflächenmaterials und den Adsorptionsbedingungen beeinflusst. Daher wurde zunächst die VEGF-Adsorption auf Silica-Magnetpartikeln bei unterschiedlichen Pufferbedingungen untersucht. Da mit Hinblick auf die Anwendung in der Affinitätsaufreinigung, das Aptamer auf seinen spezifischen Aptamerbindepuffer angewiesen ist, wurden die Pufferbedingungen auf Grundlage des Aptamerbindepuffers TBSE variiert. Das VEGF wurde in TBSE mit verschiedenen Zusätzen mit carboxyfunktionalisierten Silica-partikeln ohne Aptamermodifikation inkubiert und die unspezifische VEGF-Adsorption wurde per SDS-PAGE analysiert.

Abbildung 6.3 zeigt das silbergefärbte Proteingel nach Durchführung des Inkubationsexperiments. Es



**Abbildung 6.3:** VEGF-Adsorption an unmodifizierte Silica-Magnetpartikel.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die VEGF-Lösung vor Inkubation (V) und nach Inkubation (Ü) mit den Magnetpartikeln.

wurde für jeden Pufferzusatz jeweils die VEGF-haltige Lösung vor der Inkubation (V) und der Überstand nach der Inkubation mit den Magnetpartikeln (Ü) aufgetragen. Es wird deutlich, dass nach Inkubation in TBSE ohne Zusätze das komplette Protein von den Silica-Magnetpartikeln adsorbiert wurde, so dass im Überstand kein Protein mehr nachweisbar war. Durch Zugabe von Tween 20 und Natriumchlorid zum Bindepuffer wurde die Adsorption kaum verhindert, die Zugabe von Harnstoff bzw. SDS reduzierte die Adsorption um ca. 38 %. Insgesamt kann somit keiner der Zusätze den Adsorptionsprozess an die Silica-Partikel effektiv verhindern, zumal Harnstoff und SDS in höheren Konzentrationen das Targetprotein denaturieren würden. Da stärkere Veränderungen des Bindepuffers, z. B. die Variation des pH-Werts, mit großer Wahrscheinlichkeit eine verminderte Bindeaktivität des Aptamers zur Folge hätten, wurde auf weitere Modifikationen des Bindepuffers verzichtet. Stattdessen wurde anhand von Silica-, Polystyrol- und Agarose-Magnetpartikeln der Einfluss des Oberflächenmaterials auf die VEGF-Adsorption untersucht.

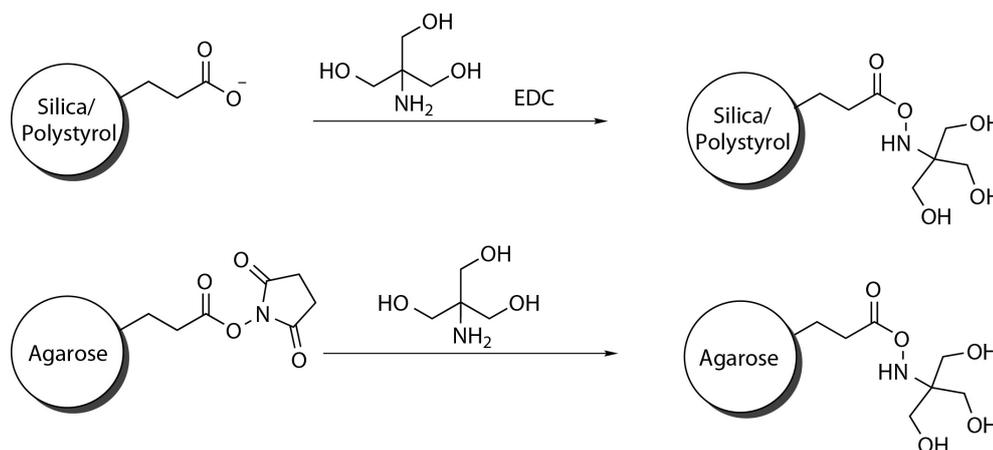
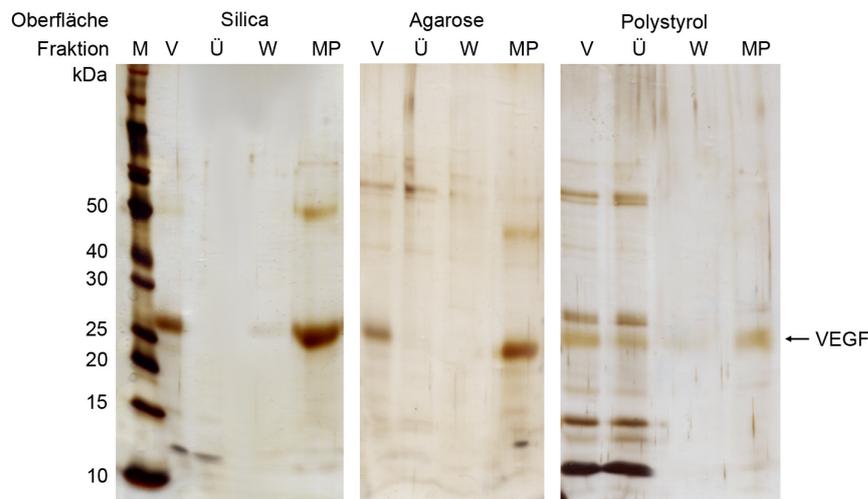


Abbildung 6.4: Konjugation von carboxylmodifizierten Magnetpartikeln mit TRIS.

Dazu wurden die verschiedenen Magnetpartikel zunächst wie in Abbildung 6.4 dargestellt mit TRIS konjugiert, um elektrostatische Wechselwirkungen der Carboxylgruppen mit dem als Kation vorliegenden VEGF zu verhindern. Die Säuregruppen der Silica- und Polystyrol-Magnetpartikel wurden dazu mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert, so dass diese im Anschluss von der Aminogruppe des TRIS nukleophil angegriffen werden konnte. Die Agarose-Magnetpartikel lagen bereits präaktiviert als NHS-Ester vor, der direkt vom TRIS substituiert werden konnte.

Die Magnetpartikel wurden jeweils mit VEGF im Aptamerbindepuffer inkubiert, der Überstand wurde abgenommen und die Partikel wurden dreimal mit Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in SDS-Probenpuffer aufgekocht, um das an die Magnetpartikel adsorbierte Protein abzulösen, und alle Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Das silbergefärbte Gel ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Das VEGF adsorbierte während der Inkubation mit den Magnetpartikeln genauso stark an die Oberflächen aus Agarose wie an die Silica-Partikel, so dass im Überstand kein Protein mehr detek-

tierbar war. Dagegen wiesen die Magnetpartikelfraktionen (MP) jeweils eine starke VEGF-Bande auf. Die VEGF-Adsorption an Polystyrol-Magnetpartikel war im Gegensatz deutlich schwächer. Im Proteingel unterscheidet sich das Bandenmuster und die Intensität der Ausgangslösung (V) nicht vom Überstand nach Inkubation mit den Magnetpartikeln (Ü). In der Magnetpartikelfraktion ist dennoch eine schwache VEGF-Bande erkennbar, die auf eine nur geringe VEGF-Adsorption hinweist. Die Polystyrol-Magnetpartikel haben sich somit als das am besten geeignete Trägermaterial für die VEGF-Aufreinigung erwiesen und wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet.



**Abbildung 6.5:** VEGF-Adsorption an verschiedene Magnetpartikeloberflächen.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die VEGF-Lösung vor Inkubation (V) und nach Inkubation (Ü) mit den Magnetpartikeln, die letzte Waschfraktion (W) und das per SDS-Probenpuffer von den Magnetpartikeln abgelöste Protein (MP).

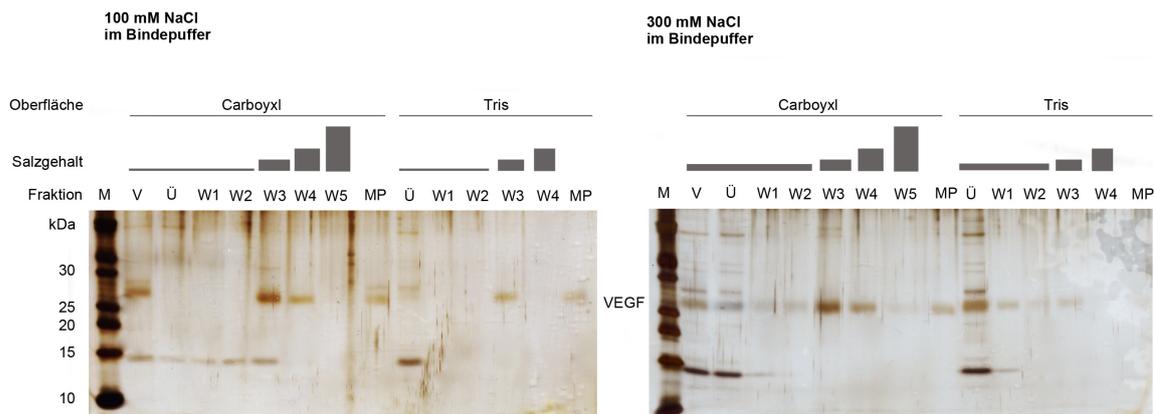
### Oberflächenmodifikation der Polystyrol-Magnetpartikel

Mit dem Ziel, die VEGF-Adsorption an die Polystyrol-Magnetpartikel vollständig zu verhindern, wurde zunächst der Adsorptionsvorgang an die Polystyrol-Oberfläche genauer untersucht. Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist ein komplexer Vorgang, der in der Regel aus einer Kombination von Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche entsteht. Je nach Protein- und Oberflächenstruktur kann die Adsorption durch eine dieser Wechselwirkungen kontrolliert werden, so dass diese der geeignete Angriffspunkt ist, um den Adsorptionsvorgang zu inhibieren.

Um herauszufinden, welche der Wechselwirkungen einen besonders starken Einfluss auf die VEGF-Adsorption an die Polystyrol-Magnetpartikel hat, wurde die Salzabhängigkeit der Adsorption untersucht. Während eine elektrostatisch kontrollierte Adsorption durch hohe Salzkonzentrationen inhibiert wird, kann eine aus anderen Wechselwirkungen resultierende Adsorption sogar verstärkt wer-

den, da die intermolekulare Abstoßung abnimmt [171].

Es wurden im Experiment sowohl carboxylmodifizierte als auch gemäß Abbildung 6.4 hergestellte TRIS-modifizierte Polystyrol-Magnetpartikel eingesetzt. Die Magnetpartikel wurden mit VEGF im Aptamerbindepuffer TBSE mit Zusatz von 100 mM oder 300 mM NaCl inkubiert, zweimal mit dem Inkubationspuffer und anschließend mit stärker salzhaltigen Puffern (500 mM, 1 M, 2 M NaCl) gewaschen. Wie das silbergefärbte Proteingel in Abbildung 6.6 zeigt, adsorbiert das VEGF (Bande bei ca. 25 kDa) stärker an die carboxylmodifizierten als an die TRIS-konjugierten Magnetpartikel. Darüber hinaus wurde die Adsorption durch Erhöhung der Salzkonzentration im Bindepuffer zum einen verringert, zum anderen konnte bereits adsorbiertes VEGF durch weitere Erhöhung der Salzkonzentration wieder eluiert werden. Aus diesen Ergebnissen kann ein elektrostatisch kontrollierter Adsorptionsvorgang abgeleitet werden. Das als Kation im Bindepuffer vorliegende VEGF kann mit den anionischen Carboxylgruppen elektrostatische Wechselwirkungen eingehen und so an die Oberfläche adsorbieren. Im Fall der TRIS-konjugierten Partikel ist es möglich, dass nicht alle Carboxylgruppen mit TRIS umgesetzt wurden und die verbleibenden Säuregruppen weiterhin das VEGF binden.



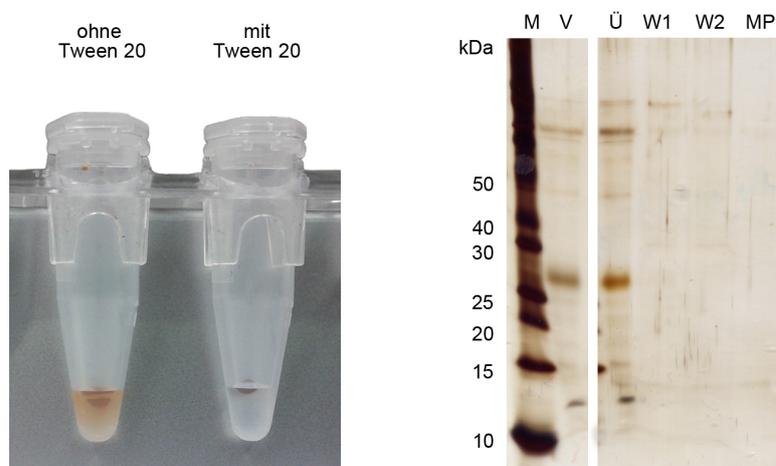
**Abbildung 6.6:** Salzabhängige VEGF-Adsorption an Polystyrol-Magnetpartikel.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die VEGF-Lösung vor Inkubation (V) und nach Inkubation (Ü) mit den Magnetpartikeln, die Waschfraktionen mit Bindepuffer (W1, W2), mit 500 mM NaCl (W3), 1 M NaCl (W4) und 2 M NaCl (W5) sowie das per SDS-Probenpuffer von den Magnetpartikeln abgelöste Protein (MP). Die Bande bei ca. 25 kDa repräsentiert das VEGF, die Bande bei ca. 15 kDa resultiert vermutlich aus Degradationsprodukten von VEGF.

Um das Problem der elektrostatischen Wechselwirkungen zu umgehen, wurden statt carboxylmodifizierter Magnetpartikel hydroxylmodifizierte Partikel getestet, die präaktiviert als Tosylate vorlagen. Dazu wurden die Tosylgruppen zunächst mit TRIS geblockt. Die Magnetpartikel wurden mit VEGF im Aptamerbindepuffer inkubiert, mit gleichem Puffer zweimal gewaschen und die Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Zur besseren magnetischen Separation wurde dem Waschpuffer 0,05 % (v/v) Tween 20 zugegeben. Wie in Abbildung 6.7 links dargestellt ist, lagern sich die Magnetpartikel ohne das Tensid aufgrund ihres hydrophoben Oberflächenmaterials auf den Wänden der aus Polypropylen

bestehenden Mikroreaktionsgefäße ab und bilden einen dünnen Oberflächenfilm. Dieser verhindert die vollständige Separation der Magnetpartikel.

In Abbildung 6.7 rechts ist das silbergefärbte Gel der SDS-PAGE-Analyse nach Durchführung des Inkubationsexperiments dargestellt. Es zeigt, dass das VEGF nicht an die hydroxylmodifizierten Polystyrol-Magnetpartikel adsorbiert und stützt somit die These eines elektrostatisch kontrollierten Adsorptionsvorgangs des VEGF an die Polystyrol-Magnetpartikel. Des Weiteren weist es die Eignung der Magnetpartikel als Trägermatrix für die Affinitätsaufreinigung von VEGF nach. Für alle folgenden Experimente wurden daher Polystyrol-Magnetpartikel mit Tosylat-aktivierten Hydroxylgruppen verwendet.



**Abbildung 6.7:** Magnetische Separation und VEGF-Adsorption an TRIS-geblockte Tosylat-aktivierte Polystyrol-Magnetpartikel.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die VEGF-Lösung vor Inkubation (V) und nach Inkubation (Ü) mit den Magnetpartikeln, die Waschraktionen mit Bindepuffer (W1, W2), und das per SDS-Probenpuffer von den Magnetpartikeln abgelöste Protein (MP).

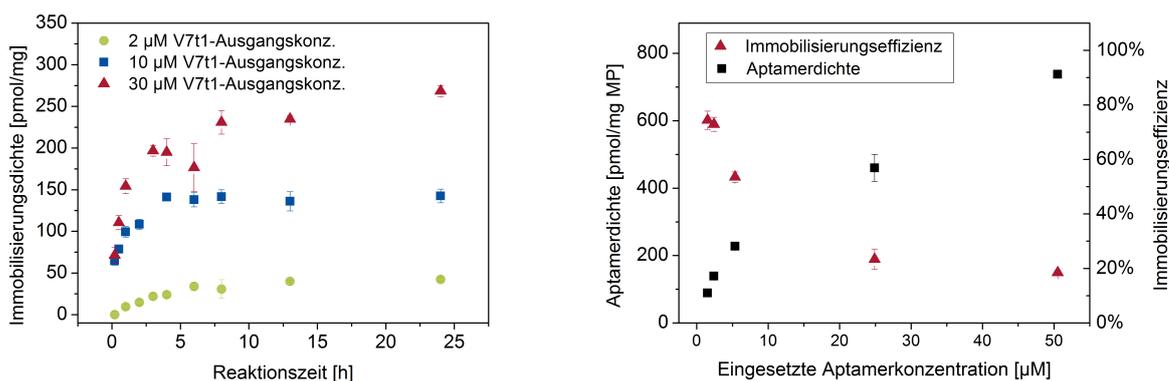
### 6.1.2 Funktionalisierung der Magnetpartikel

Um eine funktional aktive Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von VEGF zu erhalten, wurden Aptamere als Affinitätsliganden auf die Magnetpartikeloberflächen immobilisiert. Die Aptamere sollen kovalent an die Polystyrol-Magnetpartikel gebunden werden, um die Ablösung des Aptamers während des Aufreinigungsvorgangs zu verhindern. Dabei soll das Aptamer auch nach der Immobilisierung seine VEGF-Bindeaktivität erhalten. Um dies zu gewährleisten, wurde eine Methode zur Aptamerimmobilisierung per terminaler Aminogruppe etabliert. Diese erlaubt es zum einen, die Ausrichtung des Aptamers nach der Immobilisierung zu kontrollieren. Zum anderen wird durch die terminale Immobilisierung die Flexibilität des Oligonukleotids, die für die korrekte Aptamerfaltung nötig ist, am wenigsten eingeschränkt. Falls nötig, ist es weiterhin möglich, einen Spacer zwischen Aminogruppe



Nach Durchführung der Immobilisierungsreaktion wurde zunächst der Einfluss der Reaktionszeit und der eingesetzten Aptamerkonzentration auf die Reaktion und die resultierende Immobilisierungsdichte der Aptamere auf den Magnetpartikeln untersucht. Dazu wurde in der Aptamerausgangslösung sowie dem Reaktionsüberstand und in allen Waschfraktionen die Aptamerkonzentration spektrometrisch bestimmt. Aus der Differenz der absoluten Aptamermenge in der Ausgangslösung und in allen Fraktionen nach der Reaktion wurde die Menge des gebundenen Aptamers berechnet. In Abbildung 6.9 ist links die Immobilisierungsdichte der Aptamere in Abhängigkeit von der Reaktionszeit dargestellt. Es wurden drei Reaktionsansätze mit Ausgangskonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Aptamer über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Dazu wurde zu definierten Zeitpunkten je eine Probe aus jedem Reaktionsansatz entnommen und vermessen. Wie das Diagramm zeigt, wird das Gleichgewicht der Reaktion und somit die maximale Aptamerdichte unabhängig von der Aptamerausgangskonzentration nach ca. 7,5 Stunden erreicht. Für eine möglichst effiziente Immobilisierung wurde die Reaktion über Nacht für mindestens 14 Stunden durchgeführt. Die so erzielte maximale Immobilisierungsdichte ist von der eingesetzten Ausgangskonzentration des Aptamers abhängig. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass eine gewünschte Aptamerdichte auf der Oberfläche der Magnetpartikel durch Variation der eingesetzten Aptamerkonzentration eingestellt werden kann.

Wie Abbildung 6.9 rechts zeigt, steigt die Aptamerdichte auf der Oberfläche der Magnetpartikel mit steigender Aptamerausgangskonzentration. Es herrscht kein linearer Zusammenhang, da die Immobilisierungseffizienz mit steigender Aptamerausgangskonzentration abnimmt. Da die Anzahl der funktionellen Gruppen auf der Magnetpartikeloberfläche begrenzt ist, ist ein Sättigungseffekt zu erwarten, sobald das Aptamer in deutlichem Überschuss eingesetzt wird.



**Abbildung 6.9:** Einfluss von Reaktionszeit und Aptamerkonzentration auf die Aptamerimmobilisierung.

Wie weiterführende Experimente zeigten, ist die Immobilisierungsdichte zusätzlich von der Aptamersequenz und der Position der Aminogruppe am 3'- oder 5'-Terminus abhängig. Die erzielten Immobilisierungsdichten verschiedener Aptamere bei einer Ausgangskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Das Aptamer V7t1 wird über den 3'-Terminus fast doppelt so effizient immo-

bilisiert wie über die 5'-terminale Aminogruppe, so dass eine Aptamerdichte von 241,5 pmol/mg im Vergleich zu 142,5 pmol/mg erzielt wird. Möglicherweise ist der 3'-Terminus weniger direkt in die Sekundärstruktur des Aptamers eingebunden, so dass die dortige Aminogruppe für die Immobilisierungsreaktion besser zugänglich ist. Durch Einbringen zusätzlicher Nukleotide, wie im Falle der 14B- und 14T-Spacer, wird die sterische Hinderung weiter reduziert, so dass die Immobilisierungsdichte weiter gesteigert werden kann. Das Einbringen des 12EG-Spacers hingegen beeinflusst die Aptamerdichte auf der Oberfläche nicht.

**Tabelle 6.1:** Immobilisierungsdichten verschiedener Aptamere bei 10  $\mu\text{M}$  Aptamerausgangskonzentration.

Aptamer	Position der NH <sub>2</sub> -Gruppe	Immobilisierungsdichte [pmol/mg]
V7t1	3'	241,5 $\pm$ 13,0
V7t1	5'	142,5 $\pm$ 11,2
V7t1_14B	3'	319,3 $\pm$ 16,0
V7t1_14T	3'	316,0 $\pm$ 10,1
V7t1_12EG	3'	260,0 $\pm$ 14,4
Zufalls-DNA	5'	182,7 $\pm$ 6,7

Mit Hilfe des etablierten Verfahrens zur Aptamerimmobilisierung wurden Magnetpartikel mit dem Aptamer V7t1 konjugiert, das mit verschiedenen Modifikationen versehen war. Weiterhin wurden Magnetpartikel mit der Zufalls-DNA-Sequenz modifiziert. Dabei wurde auf Basis der in Tabelle 6.1 dargestellten Daten die Aptamerausgangskonzentration in den einzelnen Reaktionsansätzen so gewählt, dass für die unterschiedlichen Aptamer-Liganden vergleichbare Immobilisierungsdichten von 200–300 pmol/mg Magnetpartikel erzielt wurden. Sie wurden in den folgenden Experimenten auf ihre Eignung als Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von VEGF untersucht.

## 6.2 Funktionstestung der Aptamer-Affinitätsmatrix

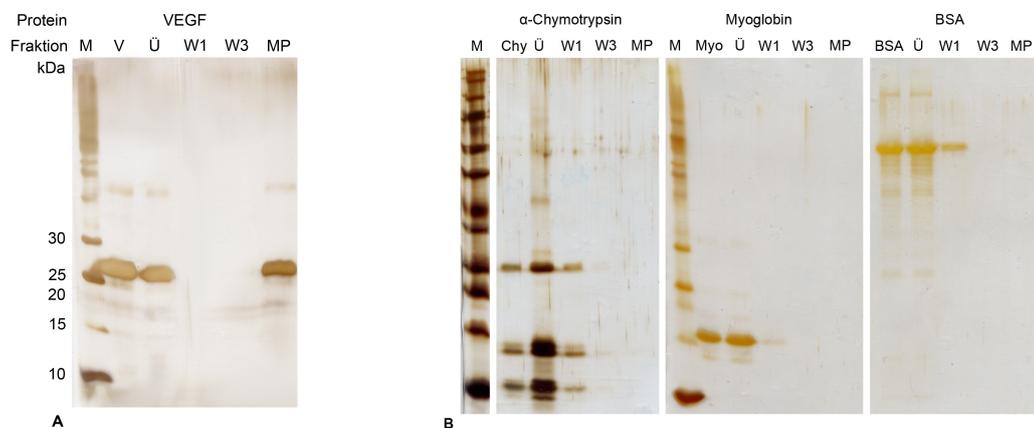
Eine Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von Proteinen muss in erster Linie in der Lage sein, ihr Targetprotein spezifisch zu erkennen und zu binden. Die Ligand-Target-Bindung muss dabei reversibel sein, damit das Target anschließend durch Änderung der Pufferbedingungen wieder eluiert werden kann. Das immobilisierte Aptamer V7t1 wurde auf seine VEGF-Bindeaktivität getestet und hinsichtlich seiner Proteinbindekapazität optimiert. Hierzu wurden verschiedene Spacer zwischen Aptamer und Oberfläche eingebracht, um die molekulare Flexibilität des Aptamers zu erhöhen und somit die Faltung zu unterstützen. Außerdem wurde der Einfluss der Immobilisierungsdichte des Aptamers auf die Proteinbindekapazität analysiert, da hohe Aptamerdichten auf den Magnetpartikeln zu sterischen Hinderungen führen können.

Abschließend wurde eine Methode zur Elution des VEGF von der Aptamer-Affinitätsmatrix etabliert.

Dazu wurden diverse Pufferbedingungen getestet und in Hinblick auf eine effiziente und proteinschonende Elution verglichen.

### 6.2.1 Charakterisierung der Proteinbindung

Zum Nachweis der Proteinbindung des immobilisierten Aptamers V7t1 wurden V7t1-3'-NH<sub>2</sub>-modifizierte Magnetpartikel mit VEGF im Bindepuffer TBSET inkubiert. Anschließend wurden die Magnetpartikel mehrfach mit Bindepuffer gewaschen und die Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Zur Untersuchung des an die Magnetpartikel gebundenen Proteins wurden die Partikel in SDS-Probenauftragspuffer aufgeköcht, wobei das Protein von den Partikeln gelöst wird. Die Partikel wurden per Zentrifugation abgetrennt und der Überstand ebenfalls per SDS-PAGE analysiert. Abbildung 6.10 A stellt das silbergefärbte Proteingel dar. Das Gel zeigt jeweils eine deutliche Proteinbande in der eingesetzten VEGF-Lösung, dem Überstand und der Fraktion der in SDS-Probenauftragspuffer aufgeköchten Magnetpartikel. Es weist somit die erfolgreiche Bindung des VEGF an die Aptamer-modifizierten Magnetpartikel nach. Die VEGF-Bande im Überstand resultiert aus dem Überschuss VEGF, der im Experiment eingesetzt wurde. Im Vergleichsexperiment mit unmodifizierten Magnetpartikeln wurde, wie in Abbildung 6.7 dargestellt, keine VEGF-Adsorption nachgewiesen. Die VEGF-Bindung erfolgt somit mittels der immobilisierten Aptamere.



**Abbildung 6.10:** Nachweis der Protein-Bindung V7t1-modifizierter Magnetpartikel per SDS-PAGE.

Es wurden V7t1-3'-NH<sub>2</sub>-modifizierte Magnetpartikel eingesetzt (Immobilisierungsdichte ca. 200 pmol/mg). Aufgetragen wurden jeweils der molekulare Größenstandard (M), die eingesetzte Proteinlösung (V - VEGF; Chy -  $\alpha$ -Chymotrypsin; Myo - Myoglobin, BSA - Bovines Serum Albumin), der Überstand nach Inkubation (Ü), die Waschfraktionen (W1; W3) und das per SDS-Probenpuffer von den Magnetpartikeln abgelöste Protein (MP).

Um die Bindespezifität zwischen V7t1 und VEGF zu analysieren, wurden drei verschiedene Negativkontrollproteine ausgewählt, die unterschiedliche isoelektrische Punkte aufweisen:  $\alpha$ -Chymotrypsin (pI 8,8), BSA (4,7) und Myoglobin (6,8/7,2). Wie bereits in anderen Arbeiten und im Rahmen der *Reverse Phase* Microarray-Experimente (5.1) gezeigt wurde, hat der isoelektrische Punkt und die damit

verbundene Nettoladung des Proteins bei gegebenem pH-Wert Einfluss auf die Aptamer-Protein-Bindung [153]. Insbesondere elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem positiv geladenem Protein und dem negativ geladenen Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat des Aptamers können zu unspezifischen Bindungen führen.

Die drei Negativkontrollproteine wurden wie oben beschrieben in einem Inkubationsexperiment mit V7t1-modifizierten Magnetpartikeln eingesetzt. Abbildung 6.10 B zeigt die silbergefärbten Proteingele nach der SDS-PAGE Analyse. Im Gegensatz zum VEGF waren die drei Negativkontrollproteine jeweils in der Ausgangslösung, dem Überstand und der ersten Waschfraktion nachweisbar. Sie wurden somit kaum von den Aptamer-modifizierten Magnetpartikeln gebunden und durch Waschen mit Aptamerbindepuffer wieder von den Magnetpartikeln gelöst, woraus die schwache Bande in der ersten Waschfraktion resultiert. Unabhängig von der Ladung des Proteins wurde keine Bindungen zwischen Protein und Aptamer ausgebildet, so dass keine unspezifischen Wechselwirkungen auftraten. Die Experimente weisen somit gegenüber den Proteinen  $\alpha$ -Chymotrypsin, BSA und Myoglobin eine spezifische VEGF-Aptamer-Bindung nach, was darauf hinweist, dass das 3'-aminomodifizierte Aptamer V7t1 auch nach der Immobilisierung auf die Magnetpartikel seine typische dreidimensionale Konformation einnehmen kann, mit der es in der Lage ist, sein Targetprotein VEGF zu erkennen und zu binden. Auf Basis dieser Ergebnisse wird im nächsten Abschnitt die VEGF-Bindekapazität der V7t1-modifizierten Magnetpartikel bestimmt, wobei untersucht wird, ob diese durch Einsatz eines Spacers gesteigert werden kann.

### **Einfluss von Spacern auf die Proteinbindung**

Die Faltung des Aptamers in seine sequenzspezifische dreidimensionale Konformation ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Targetbindung. Sie erfordert eine gewisse Flexibilität der Oligonukleotidkette, die während der Immobilisierung eingeschränkt wird. Zum einen wird das Aptamer in die unmittelbare Nähe einer festen Oberfläche gebracht, wodurch es sterisch gehindert wird. Zum anderen kann es mit benachbarten Aptameren intermolekulare Wechselwirkungen eingehen, die mit intramolekularen Wechselwirkungen, aus denen die Aptamerfaltung resultiert, konkurrieren. Die unvollständige Aptamerfaltung führt dabei zu Einschränkungen in der Erkennung und Bindung des VEGF. Durch den Einsatz von Spacer-Molekülen zwischen Aptamer und Oberfläche kann diese sterische Hinderung reduziert werden [61, 54]. Die Spacer wirken wie flexible Arme, die die Distanz zwischen Aptamer und Oberfläche vergrößern und damit die Aptamerfaltung unterstützen. Die verwendeten Spacer-Moleküle sind in Abbildung 6.11 schematisch dargestellt. Es handelt sich im Falle der 14-Thymidin (14T) oder 14-Nukleotid (14B)-Spacer um zusätzliche Nukleotide, die die Sequenz des Aptamers V7t1 am 3'-Terminus verlängern. Im Falle des Dodecaethylenglycol (12EG)-Spacers sind 12 Einheiten des Ethylenglycols am 3'-Terminus des Aptamers verankert und mit einer termina-

len Aminogruppe modifiziert. Je nach Typ vergrößern die Spacer die Distanz zwischen Aptamer und Oberfläche um 4,6 nm–7,3 nm (Tabelle 6.2).

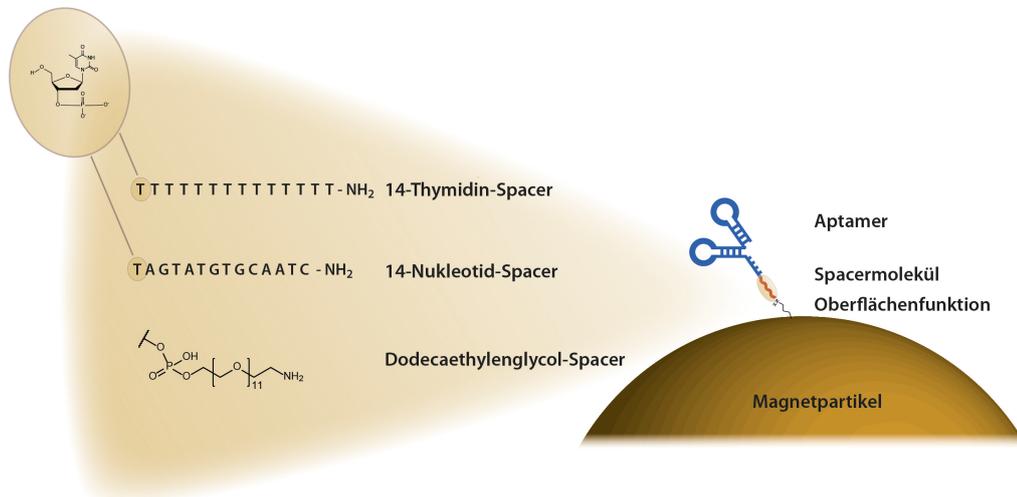


Abbildung 6.11: Schematische Darstellung molekularer Spacer zwischen Aptamer und Magnetpartikel.

Um den Einfluss der Spacer auf die VEGF-Bindung zu untersuchen, wurde das mit verschiedenen Spacern modifizierte Aptamer V7t1 sowie eine Zufalls-DNA-Sequenz in einer Dichte von durchschnittlich 225 pmol/mg auf die Magnetpartikel immobilisiert und anschließend mit einem Überschuss VEGF (ca. 2,5-fach) inkubiert. Für jeden Ansatz wurde die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung, dem Überstand und allen Waschfraktionen bestimmt und daraus die Gesamtmenge des gebundenen VEGF berechnet.

Wie in Tabelle 6.2 dargestellt, wurden vom Aptamer V7t1 ohne Spacer 96,1 pmol VEGF pro mg Magnetpartikel gebunden, während die zufällige DNA-Sequenz nur 35 pmol band. Durch Einbringen von Nukleotid-Spacern 14T und 14B wurde die Bindekapazität des V7t1 um das 1,8-fache bzw. das 2,5-fache auf bis zu 245 pmol pro mg gesteigert. Der 14B-Spacer schafft eine theoretische Distanz von 5,29 nm zwischen Aptamer und Magnetpartikeloberfläche und ist damit nur marginal länger als der

Tabelle 6.2: VEGF-Bindekapazität des Spacer-modifizierten Aptamers V7t1 nach Immobilisierung auf Magnetpartikeln.

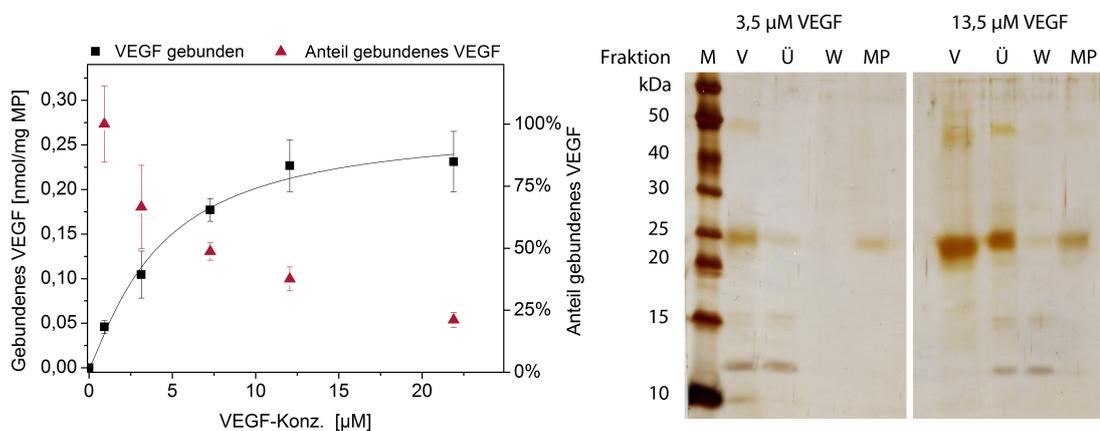
Aptamer	Spacer	Spacer-Länge [nm]*	Aptamerdichte [pmol/mg]	Gebundenes VEGF [pmol/mg]
V7t1	-	-	230 ± 15	96,1
V7t1	12EG	4,58	247 ± 11	103,2
V7t1	14T	7,28	211 ± 9	175,4
V7t1	14B	5,29	231 ± 12	245,0
Zufalls- DNA	-	-	207	35,17

\* Die Berechnung der Spacer-Längen ist in Anhang C.3 beschrieben.

12EG-Spacer, dessen positiver Einfluss auf die Bindekapazität sehr gering ist (1,1-fache Steigerung). Der 14T-Spacer ist mit 7,28 nm der längste der drei Spacer-Moleküle, jedoch nicht der effektivste. Obwohl zusätzlicher Raum, der durch einen längeren Spacer geschaffen wird, die molekulare Flexibilität des Aptamers erhöht, scheint dieser Effekt alleine die VEGF-Bindung nicht signifikant zu verbessern. Stattdessen können benachbarte Nukleotide die Targetbindung verbessern, in dem sie, wie bereits in der Literatur beschrieben, die Target-induzierte Aptamerfaltung unterstützen [62]. Der 14B-Spacer, der sich aus 14 Nukleotiden des ursprünglich selektierten Aptamer Vap7 zusammensetzt, scheint dafür am besten geeignet zu sein. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Basen entweder die Aptamerfaltung stabilisieren oder die Targetbindung in anderer Form unterstützen. Das Aptamer V7t1\_14B wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

### Einfluss der VEGF-Konzentration auf die Proteinbindung

Zur genaueren Charakterisierung der VEGF-Bindung des Spacer-modifizierten V7t1\_14B wurde das oben beschriebene Inkubationsexperiment mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen wiederholt, so dass die Gesamtmenge des eingesetzten VEGF variierte. Die Aptamerdichte betrug jeweils 275 pmol/mg. Für jeden Ansatz wurde die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung, dem Überstand und allen Waschfraktionen per Micro-BCA Assay bestimmt und daraus die Gesamtmenge und der relative Anteil des gebundenen VEGF berechnet. Sie sind in Abbildung 6.12 dargestellt.



**Abbildung 6.12:** VEGF-V7t1\_14B-Bindung in Abhängigkeit von der eingesetzten VEGF-Konzentration. Die Immobilisierungsdichte des Aptamers V7t1\_14B auf den Magnetpartikeln betrug 275 pmol/mg.

Bei geringen VEGF-Konzentrationen liegt das Aptamer als potentieller VEGF-Bindungspartner im Überschuss vor, so dass nahezu das gesamte VEGF gebunden und aus der Ausgangslösung entfernt wird. Dies verdeutlicht die in Abbildung 6.12 dargestellte SDS-PAGE Analyse. Mit steigender VEGF-Konzentration steigt die absolute Menge des gebundenen VEGF zunächst und geht dann in eine Sättigung über. An diesem Punkt ist die maximale Bindekapazität auf der Magnetpartikeloberfläche ausge-

schöpft, die bei 231 pmol/mg Magnetpartikel (MP) liegt. Da sich mit steigender VEGF-Konzentration das Mengenverhältnis zwischen VEGF und Aptamer verändert, so dass das VEGF bei hohen Konzentrationen im Überschuss vorliegt, sinkt gleichzeitig der relative Anteil des gebundenen VEGF. Das in Lösung verbleibende Protein kann somit im Überstand nachgewiesen werden.

Die maximale Bindekapazität von 231 pmol/mg wird bei einer VEGF-Konzentration von ca. 22  $\mu\text{M}$  erreicht, bei der das VEGF im vierfachen Überschuss zum Aptamer V7t1 vorliegt. Bei dieser VEGF-Konzentration haben 84 % der immobilisierten Aptamere ein VEGF-Molekül gebunden. Der Anteil des immobilisierten Aptamers, der ein VEGF-Molekül gebunden hat, wird im Folgenden als Aptameraktivität bezeichnet. Im oben beschriebenen Experiment lag die Aptameraktivität bei einem äquimolaren Verhältnis von VEGF und V7t1 bei ca. 51 %. Für einen möglichst effizienten Aufreinigungsprozess ist es erstrebenswert, die Menge des vom Aptamer gebundenen VEGF und damit die Bindekapazität auf der Magnetpartikeloberfläche zu maximieren. Weiterhin sollte die maximale Beladungsdichte schon bei möglichst geringen VEGF-Konzentrationen erreicht werden. Dies kann beispielsweise, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, durch Veränderung der Ligandendichte erfolgen.

### Optimierung der Immobilisierungsdichte

Um den Einfluss der Aptamerdichte auf die VEGF-Bindung zu untersuchen, wurde das Aptamer V7t1\_14B in unterschiedlichen Dichten zwischen 50 und 500 pmol/mg auf die Magnetpartikel immobilisiert. Anschließend wurden die modifizierten Magnetpartikel wie oben beschrieben mit einer äquimolaren Menge VEGF inkubiert. Die Menge des gebundenen VEGF und die Aptameraktivität wurden anschließend gegen die Aptamerdichte aufgetragen.

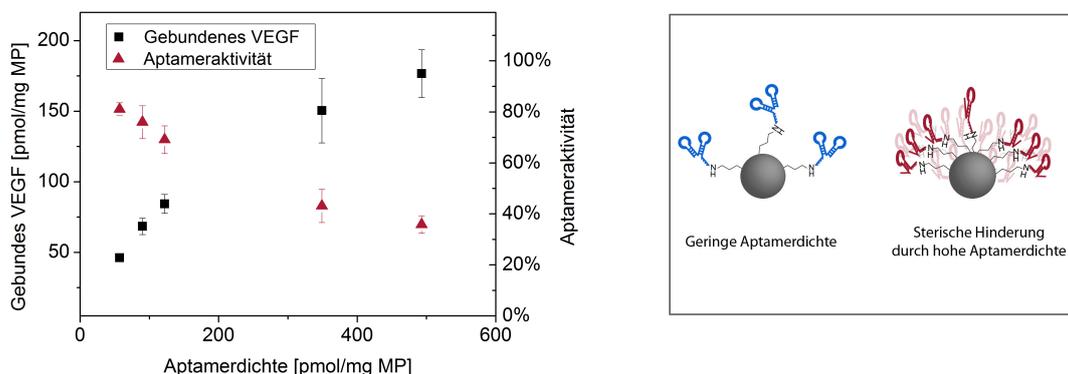


Abbildung 6.13: Einfluss der Aptamerdichte des V7t1\_14B auf die VEGF-Bindekapazität.

Das zugehörige Diagramm ist in Abbildung 6.13 links dargestellt. Es zeigt, dass die absolute Menge des gebundenen VEGF mit steigender Aptamerdichte stetig zunimmt. Es besteht ein nicht-linearer

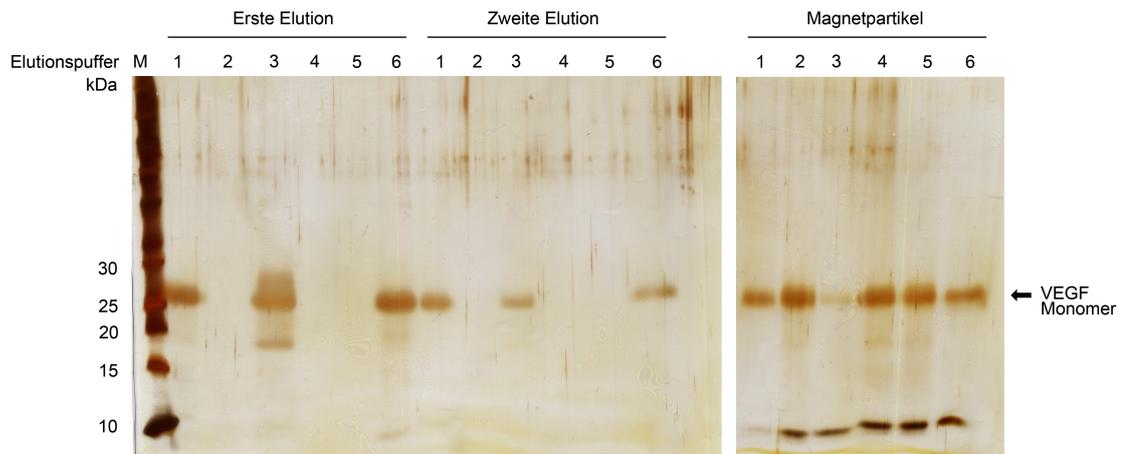
Zusammenhang, da die Aptameraktivität mit steigender Aptamerdichte abnimmt. Dies bedeutet, dass bei hohen Aptamerdichten zwar viele Ligandenmoleküle zur Verfügung stehen, von denen jedoch nur ein geringer Anteil ein VEGF-Molekül gebunden hat. Im Gegensatz dazu sind bei geringer Aptamerdichte der überwiegende Teil der Aptamere an ein VEGF-Molekül gebunden. Möglicherweise ist die eingeschränkte VEGF-Bindekapazität bei hohen Aptamerdichten auf der Oberfläche der Magnetpartikel, wie in Abbildung 6.13 rechts schematisch dargestellt, auf sterische Hinderungen und Interaktionen benachbarter Aptamere zurückzuführen. Diese verhindern die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Faltung des Aptamers und beeinflussen somit die VEGF-Bindung. Bei niedrigen Aptamerdichten ist der Abstand zwischen benachbarten Aptameren größer und der Raum für die typische Aptamerfaltung ist daher ausreichend.

Anhand der in Abbildung 6.13 dargestellten Daten kann bei einer Aptamerdichte von 275 pmol/mg eine Aptameraktivität von ca. 50 % vorhergesagt werden. Diese ist mit den im vorherigen Abschnitt ermittelten und in Abbildung 6.12 dargestellten Daten vergleichbar. Durch Verringerung der Aptamerdichte auf unter 200 pmol/mg kann die Aptameraktivität auf über 80 % gesteigert werden, wobei die höchste Aptameraktivität von 81,3 % bei einer Dichte von 57 pmol pro mg MP erzielt wurde. Auf diese Weise ist es somit möglich, hohe Beladungsdichten der Magnetpartikel bei äquimolarem Konzentrationsverhältnis von Aptamer und VEGF zu erreichen. Für eine effizienten Nutzung der immobilisierten Aptamere ist eine geringe Aptamerdichte anzustreben, wohingegen die Proteinbindekapazität der Magnetpartikel mit steigender Aptamerdichte zunimmt. In Hinblick auf einen effizienten Aufreinigungsprozess muss hier ein Kompromiss gefunden werden.

### 6.2.2 VEGF-Elution

Um das VEGF von der Affinitätsmatrix zu eluieren, muss seine Affinität zum Aptamer reduziert werden, wodurch das VEGF zurück in die flüssige Phase gedrängt wird. Dies kann zum einen durch Puffer erfolgen, die die intramolekularen Wechselwirkungen zwischen Protein und Aptamer inhibieren ohne dabei einen der Bindungspartner zu schädigen. Zum anderen kann das Protein kompetitiv durch Verdrängung mit einem strukturell ähnlichen Molekül eluiert werden [172]. Da die G-Quadruplex, in die sich das Aptamer V7t1 faltet, auf die Anwesenheit von stabilisierenden Kationen angewiesen ist, ist es weiterhin denkbar, durch Veränderung der Salzkomponenten im Puffer die Faltungsstruktur des Aptamers zu destabilisieren und so die Elution des VEGF zu ermöglichen. Unabhängig von der gewählten Elutionsstrategie ist darauf zu achten, dass die gewählten Elutionsbedingungen nicht zur Denaturierung des VEGF führen.

Zur Analyse geeigneter Elutionsbedingungen wurden Aptamer-modifizierte Magnetpartikel nach Inkubation mit VEGF und anschließendem Waschen in sechs verschiedene potentielle Elutionspuffer gebracht. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt und die erste und zweite Elutionsfraktion



**Abbildung 6.14:** Vergleich verschiedener Pufferbedingungen zur Elution von VEGF.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die ersten und zweiten Elutionsfraktionen sowie die Magnetpartikelfraktion nach Inkubation mit TBSET + 3 M Harnstoff (1); TBSET ohne KCl (2); TBSET + 1 M NaCl (3); PBST pH 4,5 (4); TBSET pH 9 (5); denaturierender Puffer mit Harnstoff und DTT pH 9,8 (6). Die Banden bei 10 kDa sind vermutlich entweder auf Aptamere oder auf Bestandteile der Magnetpartikel zurückzuführen, die beim Aufkochen im SDS-Probenpuffer vom Partikel gelöst werden.

sowie das verbleibende Protein auf den Magnetpartikeln wurde per SDS-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 6.14 dargestellt, wurde das VEGF durch Zugabe von Harnstoff und Natriumchlorid zum Bindepuffer, sowie durch den denaturierenden Puffer von der Affinitätsmatrix eluiert. Die moderate Veränderung des pH-Wertes und der Entzug von Kaliumionen als potentesten Ionen zur Stabilisation der G-Quadruplex hingegen hatten keinen Einfluss auf die Protein-Aptamer-Bindung. Es ist fraglich, ob die bereits in eine G-Quadruplex eingeschlossenen Kaliumionen wieder freigesetzt werden oder trotz Änderung der Pufferbedingungen weiterhin gebunden bleiben und zur Stabilisierung der G-Quadruplex zur Verfügung stehen. Darüber hinaus kann die stabilisierende Funktion des Kaliums mit Einschränkungen auch von einigen anderen Kationen wie Natrium- oder Lithiumionen erfüllt werden [173].

Der Einsatz des denaturierenden Puffers und der Zusatz von 3 M Harnstoff zum Bindepuffer eignen sich zwar zur Elution des VEGF von der Affinitätsmatrix, sie sind jedoch für den praktischen Einsatz in der Proteinaufreinigung nicht geeignet, da sie die meisten Proteine irreversibel denaturieren und somit die Elution eines funktional aktiven Proteins unmöglich machen. Die salzabhängige Proteinelution ist hingegen eine milde Elutionsstrategie, die die Proteinkonformation in der Regel nicht beeinflusst [174]. Die erhöhte Ionenstärke im Puffer inhibiert elektrostatische Wechselwirkungen, die vermutlich einen großen Anteil an der VEGF-Aptamer-Bindung haben. Darüber hinaus erlaubt die salzabhängige Elution eine einfache Regeneration der Affinitätsmatrix durch Waschen mit geringer Salzkonzentration und das Natriumchlorid ist durch Dialyse einfach aus dem Eluat entferbar.

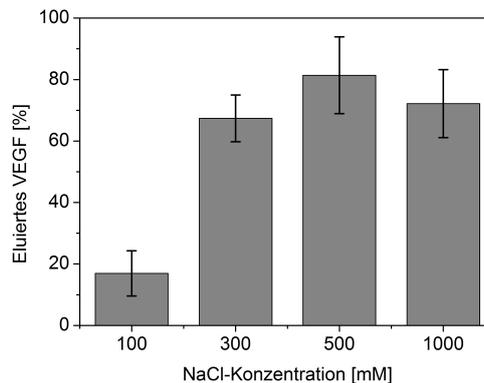


Abbildung 6.15: Salzabhängige Elution von VEGF mit Natriumchlorid,

Zur Optimierung der Elutionseffizienz wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren die salzabhängige VEGF-Elution genauer analysiert. Hierzu wurde das VEGF zunächst in einem Reaktionsansatz an die Magnetpartikel gebunden. Die Magnetpartikel wurden auf vier Reaktionsgefäße verteilt und das VEGF wurde mit 100, 300, 500 bzw. 1000 mM Natriumchlorid in TBSET-Puffer eluiert. Die VEGF-Konzentration in den Elutionsfraktionen wurde bestimmt und der relative Anteil des eluierten VEGF wurde berechnet. Dieser ist in Abbildung 6.15 in Abhängigkeit zur eingesetzten Natriumchloridkonzentration dargestellt. Es wird deutlich, dass bereits durch Zusatz von 300 mM NaCl zum Bindepuffer mehr als 60 % des VEGF eluiert wurden, bei Zusatz von 500 mM NaCl wurde die maximale Elutionseffizienz von 81,4 % erreicht. Damit ist eine effiziente VEGF-Elution bereits bei moderat erhöhter Salzkonzentration möglich.

### 6.2.3 Regeneration der Affinitätsmatrix

Die erfolgreiche salzabhängige Elution des VEGF lässt darauf schließen, dass die Affinitätsmatrix nach mehrfachem Waschen mit salzarmem Puffer wieder regeneriert werden kann. Da bei der maximal erzielten Elutionseffizienz von 81,4 % ein erheblicher Anteil des Proteins auf der Affinitätsmatrix gebunden bleibt, ist zu erwarten, dass die Proteinbindekapazität nach jedem Verwendungszyklus abnimmt. Um dies zu verhindern wurde die Matrix in zwei Schritten regeneriert. Nach der Elution des VEGF wurden die Magnetpartikel zunächst für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Aptamere und die Proteinreste zu denaturieren. Während die Proteindenaturierung irreversibel ist, können sich die Aptamere während einer Abkühlphase wieder falten. Durch mehrfaches Waschen mit Aptamerbindepuffer wurden im Anschluss denaturierte Proteine und Salzreste entfernt, so dass die Affinitätsmatrix für die weitere Verwendung bereit war

Um den Erfolg der Aptamerregeneration zu überprüfen, wurden die V71-modifizierten Magnetpartikel mehreren Zyklen von VEGF-Bindung und -Elution unterzogen, wobei sie nach jedem Verwen-

dungszyklus mittels des beschriebenen Schemas regeneriert wurden. Für jeden Zyklus wurde die Proteinbindekapazität berechnet. Aus der Darstellung in Abbildung 6.16 wird deutlich, dass die VEGF-Bindekapazität über vier Zyklen nahezu konstant ist und noch bei 90 % der Ausgangsbindekapazität liegt. Dies ist eine deutliche Steigerung gegenüber dem erwarteten Verlust von ca. 20 % pro Zyklus ohne Regeneration.

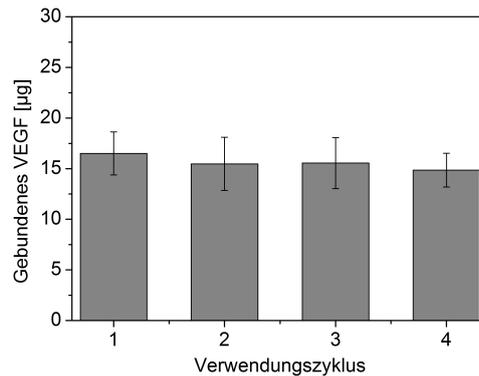


Abbildung 6.16: VEGF-Bindekapazität der Affinitätsmatrix nach Regeneration.

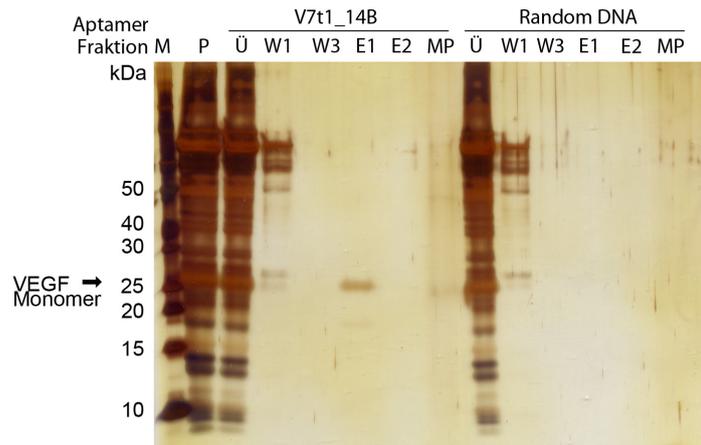
Es wurde somit nachgewiesen, dass die Wiederverwendung der Aptamer-Affinitätsmatrix nach Entfernen des zur Elution verwendeten Natriumchlorids möglich ist. Der sinkenden VEGF-Bindekapazität wird dabei durch die Hitzeregeneration erfolgreich entgegen gewirkt. Somit sind die Grundsteine gelegt, um die Affinitätsmatrix zur Aufreinigung von VEGF einzusetzen. Sollte hierfür ein Upscaling im Säulenmaßstab notwendig sein, ist es denkbar, die Hitzeregeneration durch Spülen mit vorgeheizter Pufferlösung durchzuführen. Darüber hinaus sind die Aptamere säure- und basenstabil, so dass es weiterhin möglich ist, die Aptamersäule mit Natronlauge zu spülen, Dieses Verfahren wird in der industriellen Anwendung häufig zur Reinigung und Dekontamination von Chromatographiesäulen verwendet.

## 6.3 Verwendung der Aptamer-Affinitätsmatrix zur VEGF-Aufreinigung

### 6.3.1 Aufreinigung aus komplexen Proteinproben

Basierend auf den etablierten Methoden wurde die Aptamer-Affinitätsmatrix auf ihre Eignung zur Aufreinigung von VEGF aus komplexen Proteingemischen untersucht. Hierzu wurde zunächst zur Simulation eines proteinreichen Zellysats 1 mg/mL FCS mit 200 µg/mL VEGF in Aptamerbindepuffer gemischt und mittels der V7t1-modifizierten Magnetpartikel aufgereinigt. Zum Vergleich wurde

das selbe Gemisch mit Magnetpartikeln inkubiert, die mit der DNA-Zufallssequenz modifiziert waren. Alle Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und das Gel densitometrisch ausgewertet. Wie Abbildung 6.17 zeigt, wurde das VEGF vom immobilisierten V7t1 spezifisch gebunden und nach Zugabe von Natriumchlorid wieder eluiert. Dabei wurde eine Reinheit von 91 % erzielt. Im Gegensatz dazu war keine Bindung an die Zufalls-DNA zu beobachten, was die spezifische Aptamer-Target-Bindung unterstreicht.



**Abbildung 6.17:** Aptamer-basierte VEGF-Aufreinigung aus einem komplexen Proteingemisch.

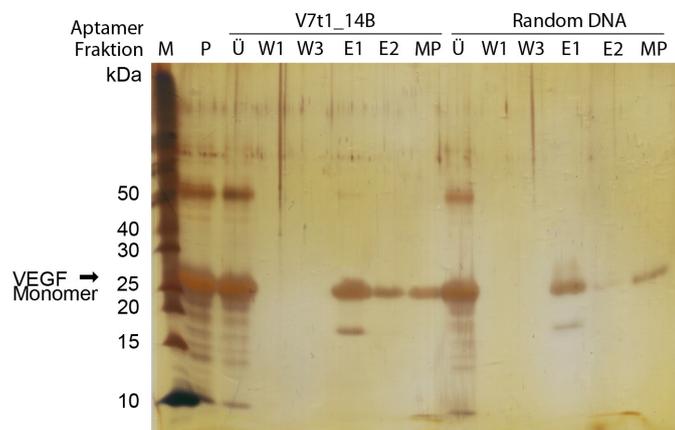
Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die komplexe FCS-Probe (F) sowie jeweils der Überstand nach Inkubation (Ü) mit entweder V7t1\_14B oder der Zufalls-DNA. Weiterhin jeweils die Waschfraktionen 1 und 3 (W1, W3), die Elutionsfraktionen 1 und 2 (E1, E2) und die Magnetpartikelfraktion (MP).

Dennoch ist die VEGF-Aufreinigung aus dem komplexen Proteingemisch nur ein Modellprozess und die Aufreinigung aus einem realen Zellysate oder der solubilisierten *Inclusion-Bodies*-Fraktion deutlich komplexer. So liegen im Zellysate beispielsweise diverse DNA-bindende Proteine vor [175], die ebenfalls an das DNA-Aptamer binden und zu einer verminderten Spezifität des Aufreinigungsprozesses führen können. Bei der Proteinaufreinigung aus der solubilisierten *Inclusion-Bodies*-Fraktion kann insbesondere der Puffer ein Problem darstellen. Zur Solubilisierung des ausgefallenen Proteins ist ein denaturierender Puffer notwendig, der die Faltungsstrukturen der Proteine auflöst und sie so zurück in Lösung bringt. Dieser Puffer kann wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben (Abbildung 6.14) zur Elution des VEGF eingesetzt werden und stört somit die Wechselwirkungen zwischen Protein und Aptamer. Stattdessen ist das Aptamer auf seinen Bindepuffer angewiesen.

Zur Aufreinigung des VEGF aus *Inclusion-Bodies*-Solubilisat wurde dieses daher 1:10 mit Aptamerbindepuffer verdünnt und anschließend mit den Aptamer-Magnetpartikeln inkubiert. Die SDS-PAGE Analyse, dargestellt in Abbildung 6.18, zeigt, dass das VEGF trotz der nicht optimalen Pufferverhältnisse vom V7t1 gebunden werden konnte. Neben der VEGF-Bande ist im Eluat noch eine weitere Bande erkennbar. Dies ist möglicherweise ein nicht vollständig translatiertes VEGF-Fragment, ein

Degradationsprodukt oder ein bakterielles Protein, welches unspezifisch an das Aptamer V7t1 bindet. Die Reinheit des VEGF in der ersten Elutionsfraktion beträgt daher nur 63,6 % im Vergleich zu 81,2 % in der zweiten Elutionsfraktion. Ebenfalls zu beobachten ist eine gewisse unspezifische Bindung an die Zufalls-DNA. Dies, wie auch die nicht vollständige Elution des VEGF nach drei Elutionsschritten, ist möglicherweise auf die deutlich höhere VEGF-Konzentration in der *Inclusion-Bodies*-Fraktion im Vergleich zum selbst hergestellten komplexen Proteingemisch zurückzuführen.

Alles in allem war die Aptamer-basierte Aufreinigung des VEGF aus der solubilisierten *Inclusion-Bodies*-Fraktion erfolgreich, wobei der Prozess in Bezug auf die eingesetzten VEGF-Mengen und die Bindespezifität noch Optimierungspotential bietet.



**Abbildung 6.18:** Aptamer-basierte VEGF-Aufreinigung aus *Inclusion-Bodies*-Solubilisat.

Aufgetragen wurden der molekulare Größenstandard (M), die komplexe *Inclusion-Bodies*-Probe (P) sowie jeweils der Überstand nach Inkubation (Ü) mit entweder V7t1\_14B oder der Zufalls-DNA. Weiterhin jeweils die Waschfraktionen 1 und 3 (W1, W3), die Elutionsfraktionen 1 und 2 (E1, E2) und die Magnetpartikelfraktion (MP).

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von Aptameren als Affinitätsliganden zur Detektion und Aufreinigung rekombinant produzierter Proteine untersucht. Hierzu wurde der humane Wachstumsfaktor VEGF als Modellprotein eingesetzt, der rekombinant in *E. coli* produziert und chromatographisch aufgereinigt wurde. Aus der Literatur wurden die vier VEGF-bindenden DNA-Aptamere V7t1, Del5-1, SL2B und 33t5 ausgewählt. Zunächst wurde ihre Affinität zum VEGF per EMSA und MST nachgewiesen.

### Aptamer-basierte Detektion

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit wurden die vier Aptamere zur Entwicklung Microarray-basierter Detektionssysteme zum Nachweis von VEGF eingesetzt. Hierbei wurden sowohl Aptamer-Microarrays im *Reverse Phase* als auch im *Sandwich* Format entwickelt und charakterisiert. Beide Formate ermöglichen die VEGF-Detektion mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Aptamere, so dass keine Markierung der Proteinprobe notwendig ist. Die Assays wurden hinsichtlich des Spotting-Verfahrens, der Inkubationsbedingungen und der verwendeten Aptamere optimiert, wobei sich je nach Format unterschiedliche Parameter als geeignet erwiesen. Diese sind in Anhang B.7.1 und B.7.2 zusammengefasst. Wichtige Kenngrößen zur Charakterisierung der Detektionssysteme sind die Sensitivität, der dynamische Bereich und die Spezifität. Sie wurden für beide Formate untersucht und sind in Tabelle 7.1 dargestellt.

Die Nachweisgrenze des Microarray Assays im *Reverse Phase* Format liegt bei 1,1  $\mu\text{M}$  und sein dynamischer Bereich reicht bis mindestens 17,5  $\mu\text{M}$ . Er ermöglicht damit die Detektion von VEGF im vergleichsweise hohen Konzentrationsbereich. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, eignet sich der *Reverse Phase* Assay beispielsweise zur Überwachung der rekombinanten Proteinproduktion, bei der hohe Proteinkonzentrationen anfallen. Er ermöglicht es, simultan verschiedene Proben auf ihren VEGF-Gehalt zu untersuchen. Daher ist es ebenfalls denkbar, ihn zur Überwachung der Proteinaufreinigung einzusetzen. Die Spezifität des Assays wurde analysiert, indem neben dem VEGF auch ausgewählte Nicht-Targetproteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten untersucht wurden. Dabei wurden anhand der Beispielproteine BSA und Myoglobin keine unspezifischen Bindungen zu Proteinen mit saurem und neutralem pI nachgewiesen. Weiterhin wurden keine Wechsel-

**Tabelle 7.1:** Nachweisgrenzen und Spezifitäten der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Aptamer-Microarrays.

	<i>Reverse Phase Assay</i>	<i>Sandwich Assay</i>
Nachweisgrenze	1100 nM	<50 nM
<b>Spezifität gegenüber</b>		
BSA	+	+
Myoglobin	+	+
Casein	Nicht untersucht	+
FCS	+	Nicht untersucht
$\alpha$ -Chymotrypsin	–	–
	Unspezifische Wechselwirkungen	Stört Aptamer-VEGF-Bindung
<i>E. coli</i> Zelllysate	–	
	Unspezifische Wechselwirkungen	Nicht untersucht

wirkungen mit dem komplexen Proteingemisch FCS beobachtet. Gegenüber dem basischen Protein  $\alpha$ -Chymotrypsin und dem vermutlich DNA-bindende Proteine enthaltenden *E. coli* Zelllysate hingegen traten unspezifische Wechselwirkungen auf, aus denen falsch-positive Signale resultierten. Die Detektion des VEGF ist dabei dennoch möglich, wenn eine Negativkontrolle mit VEGF-freier Probe oder Zelllysate mitgeführt wird oder mögliche Störsubstanzen bei Bedarf vor Durchführung des Assays abgetrennt werden.

Auch für den Microarray Assay im *Sandwich* Format wurde die Spezifität der VEGF-Bindung gegenüber den Kontrollproteinen BSA, Myoglobin und Casein nachgewiesen, wohingegen das basische Protein  $\alpha$ -Chymotrypsin den Assay störte. In diesem Fall wurden keine unspezifischen Signale beobachtet, jedoch wurde die Aptamer-VEGF-Bindung durch Anwesenheit des  $\alpha$ -Chymotrypsins gehindert. Für die praktische Anwendung sind wie im *Reverse Phase Assay* auch hier VEGF-freie Negativkontrollen und im Bedarfsfall die Abtrennung von Störsubstanzen notwendig. Der Microarray Assay im *Sandwich* Format ist mit einer Nachweisgrenze von unter 50 nM mehr als 20-fach sensitiver als der *Reverse Phase Assay*. Damit besitzt der *Sandwich* Microarray das Potential, in der Diagnostik Anwendung zu finden, wo sehr geringe VEGF-Konzentrationen detektiert werden müssen. Da die erwartete VEGF-Konzentration in menschlichen Blut- oder Gewebeproben jedoch im niedrigen picomolaren Bereich [126] und somit um vier Größenordnungen unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegt, ist eine weitere Optimierung notwendig. Hierbei spielt insbesondere die Affinität der Aptamere zum VEGF eine wichtige Rolle. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aptamere weisen Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich auf. Durch Einsatz von Aptameren mit höherer Affinität zum VEGF ist eine verringerte Nachweisgrenze zu erwarten. Ein für diese Zwecke vielversprechendes DNA-Aptamer mit einer Dissoziationskonstante von 0,4 pM wurde 2013 von Kimoto *et al.* selektiert [123].

Um die praktische Anwendbarkeit beider Microarray Assay-Formate zu verbessern, sollte im Rahmen weiterführender Arbeiten die unspezifischen Wechselwirkungen zu basischen Proteinen sowie

zu Bestandteilen komplexer Proben wie Zelllysaten genauer charakterisiert werden. Die verwendeten Protokolle zur Protein- und Aptamerimmobilisierung sowie zur Durchführung des Detektions-Assays können weiterhin auf andere Aptamer-Target-Paare übertragen werden. Dies ermöglicht es, mehrere Aptamere auf einem Microarray zu verwenden und so einen Multiplex-Assay zur parallelen Detektion mehrerer Proteine aufzubauen, um das Potential der Microarraytechnologie vollständig auszunutzen.

### Aptamer-basierte Aufreinigung

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde eine Aptamer-basierte Aufreinigungsstrategie für VEGF etabliert. Hierzu wurde das VEGF-bindende Aptamer V7t1 auf Magnetpartikel immobilisiert, die im Anschluss als Affinitätsmatrix zur Proteinaufreinigung dienen. Die Kenngrößen der Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

**Tabelle 7.2:** Kenngrößen der Proteinbindung und -elution der entwickelten Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF.

Maximale erreichte Bindekapazität*	177 pmol/mg
Maximale erreichte Aptameraktivität*	81,3 %
Elutionseffizienz	81,4 %
Verbleibende Bindekapazität nach 4 Nutzungszyklen	90 % der Ausgangsbindekapazität
Reinheit nach Aufreinigung aus FCS**	91 %
Reinheit nach Aufreinigung aus IB-Solubilisat**	63,6 %

\*bei äquimolarem Verhältnis von Aptamer und VEGF

\*\*bestimmt per Densitometrie

Zunächst wurde die VEGF-Bindung der immobilisierten Aptamere analysiert und die Proteinbindekapazität durch Einbringen von Spacern zwischen Aptamer und Magnetpartikel sowie durch Variation der Aptamerdichte optimiert. Sowohl die Verwendung von Spacern als auch geringe Aptamerdichten tragen zur Verminderung sterischer Hinderungen bei. Sie unterstützen so die Aptamerfaltung und in Folge dessen die Targetbindung. Der Vergleich verschiedener Spacer-Typen zeigte, dass zusätzliche Nukleotide zwischen Aptamer und Oberfläche sich besonders als Spacer eignen, indem sie möglicherweise die Aptamerkonformation stabilisieren. Bei einer geringen Aptamerdichte von 57 pmol/mg und Verwendung eines 14-Nukleotid-Spacers wurde eine maximale Aptameraktivität von 81,3 % erreicht. Geringe Aptamerdichten begünstigen somit erwartungsgemäß die Aktivität des immobilisierten Aptamers, während eine optimale Ausnutzung der Magnetpartikeloberfläche bei hohen Aptamerdichten erreicht wird. So wurde bei einer Immobilisierungsdichte von 493 pmol/mg eine Bindekapazität von 177 pmol VEGF/mg MP erzielt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass unter diesen Bedingungen 64 % des immobilisierten Aptamers keine VEGF-Bindeaktivität zeigt. Je nach Kosten für Trägermaterial und Aptamer sowie dem Wert des aufzureinigenden Proteins muss hier in Hinblick auf einen ökonomischen Aufreinigungsprozess ein Kompromiss zwischen optimaler Ausnutzung der Affinitätsliganden

und der Trägermatrix gefunden werden.

Im Anschluss an die VEGF-Bindung wurde die Elution des Targetproteins analysiert, wobei sich eine salzabhängige Elution mit Natriumchlorid als geeignet erwies. Sie ermöglicht es, durch Zugabe von 500 mM NaCl zum Bindepuffer 81,4 % des gebundenen VEGF zu eluieren. Ein großer Vorteil dieser Elutionsmethode ist die Möglichkeit, das Salz im Anschluss an den Aufreinigungsprozess per Dialyse aus der Proteinlösung zu entfernen und das Protein gleichzeitig in den für seine spätere Verwendung notwendigen Puffer zu überführen. Auch die Affinitätsmatrix kann durch Spülen mit Puffer in Kombination mit der Hitzedenaturierung der Aptamere von Salz- und Proteinresten befreit werden. Nach anschließender Regeneration der Aptamerfaltung durch Spülen mit Aptamerbindepuffer ist es möglich, die Aptamer-modifizierten Magnetpartikel wiederzuverwenden. Dies wurde über vier Verwendungszyklen erfolgreich durchgeführt, wobei die Bindekapazität im letzten Zyklus noch bei 90 % der Ausgangsbindekapazität lag.

Die entwickelte Methode zur Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF wurde abschließend auf ihre praktische Anwendbarkeit auf komplexe Proben untersucht. Die Aufreinigung des VEGF war sowohl aus der simulierten komplexen Probe bestehend aus VEGF in verdünntem FCS als auch im verdünnten *Inclusion-Bodies*-Solubilisat der rekombinanten VEGF-Produktion erfolgreich. Die Reinheit des VEGF nach Aufreinigung aus FCS lag dabei bei 91 % und nach Aufreinigung aus IB-Solubilisat bei 63,6 %, wobei die Verunreinigung hierbei vermutlich aus einem VEGF-Fragment resultiert. In weiterführenden Versuchen könnte die Elution durch Anwendung eines Stufengradienten optimiert werden, um die Verunreinigung vom VEGF abzutrennen.

Insgesamt ist die Anwendbarkeit des Aptamers V7t1 für die Affinitätsaufreinigung als positiv zu bewerten. Im Gegensatz zur Anwendung zur VEGF-Detektion ist die Affinität des Aptamers V7t1 zum VEGF für einen effizienten Aufreinigungsprozess ausreichend und ermöglicht es insbesondere, das Protein unter milden Bedingungen wieder zu eluieren. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Aptamerimmobilisierung auf Magnetpartikel sollten in Hinblick auf eine präparative Anwendung in weiterführenden Experimenten auf Säulenmaterialien oder Membranadsorber übertragen werden, um die Aufreinigung des VEGF in größerem Maßstab per FPLC zu ermöglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Materialbeschaffenheit ist es dabei notwendig, die Parameter zur Aufreinigung, wie z. B. die Aptamerdichte und den Probenfluss für jedes System zu optimieren. Gelingt diese Übertragung, können Aptamere in der Affinitätsaufreinigung rekombinanter Proteine eine Alternative zu üblichen Affinitätsliganden wie Antikörpern, Protein A oder Heparin sein.

# A Materialien

## A.1 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäule HisTrap FF, 1 mL	GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE
Chromatographiesäule HiTrap HP Heparin, 5 mL	GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE
Vakuumsfiltrationseinheit, Sartolab BT 180C5	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Einwegspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Filterpapier, dick	Bio-Rad, München, DE
Impföse, steril	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kanülen	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 mL/2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten, 96 Well	Brand, Wertheim, DE
PCR-Platten, 96 Well	Fisher Scientific, Schwerte, DE
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
PVDF Immun-Blot-Membran	Bio-Rad, München, DE
Skalpell	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
Spritzenvorsatzfilter, Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Zentrifugalkonzentratoren, VivaSpin 20/500, 3 kDa, 10 kDa MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Zentrifugengefäße, 15 mL/50 mL	Corning Inc., Corning, NY

## A.2 Geräte

Analysenwaage, ED224S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Autoklav, Systec V-150	Systec, Wettenberg, DE
DNA-Elektrophoresekammer, Classic	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Erlenmeyerkolben mit Schikanen, 100 mL, 500 mL, 2 L	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fluoreszenzscanner, GenePix 4000B	Molecular Devices, Sunnyvale, CA
FPLC-System, ÄktaPure	GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE
Geldokumentation Gel iX Imager	Science Imaging Instruments, Göttingen, DE
Inkubationskammern, IC-16	Schott Nexterion, Jena, DE
Inkubationsschrank, Hybaid	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Magnetrührer	MSH Basic, IKA-Werke, Staufen, DE
Magnetständer, DynaMag-2	Life Technologies, Carlsbad, CA
Mehrkanalpipette, 12 Kanal	Mettler Toledo, Gießen, DE
Mikrothermophorese, Monolith NT.115	NanoTemper, München, DE
NanoPlotter NP 2.1	GeSiM, Großerkmannsdorf, DE
Orbitalschüttler, Sea Star	Carl Roth, Karlsruhe, DE
pH-Elektrode	HANNA Instruments, Kehl am Rhein, DE
Pipetten, Transferpette	Brand, Wertheim, DE
Proteingelstation SE260	Hoefler, Holliston, MA
Reinstwasseranlage, Arium 611	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Rotator für 1,5 und 2 mL Gefäße	VWR International, Darmstadt, DE
Schüttelinkubator, Certomat BS1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Spektralphotometer, NanoDrop 1000	PeqLab-Biotechnologie, Erlangen, DE
Spektrophotometer, Epoch	BioTek Instruments, Winooski, VT
Thermocycler, Doppio	VWR International, Darmstadt, DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Ultraschallbad, Sonorex Super RK 510 H	Bandelin, Berlin, DE
Ultraschallsonde, Labsonic	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Western Blot, Trans-Blot® SD	Bio-Rad, München, DE
Zentrifuge für 1,5 und 2 mL Gefäße, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Zentrifuge für 15 und 50 mL Gefäße, X3	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Zentrifuge für Mikrotiterplatten, 5702	Eppendorf AG, Hamburg, DE

## A.3 Microarray-Substrate und Magnetpartikel

### Microarray-Substrate

UniSart® 3D Nitro slide, 16 pads	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
3D-Aldehyd Glas-Slides	PolyAn, Berlin, DE

### Magnetpartikel

Dynabeads M-270, Carboxyl	Life Technologies, Carlsbad, CA
Dynabeads M-280, Tosyl-activated	Life Technologies, Carlsbad, CA
Bio Mag® Carboxyl	Polysciences Inc., Warrington, PA
NHS Mag Sepharose™	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE

## A.4 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, CH
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ampicilin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Fluka, Buchs, CH
Carbenicillin	AppliChem, Darmstadt, DE
CHES	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Buchs, CH
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMSO	Merck, Darmstadt, DE
D-Trehalose	Fluka, Buchs, CH
EDC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
EDTA	Fluka, Buchs, CH
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, DE
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt, DE
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

---

Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Harnstoff	Fluka, Buchs, CH
HCl	Fluka, Buchs, CH
Hefextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Imidazol	Merck, Darmstadt, DE
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
L-Cystein	AppliChem, Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdesoxycholat	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumthiosulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NP-40	Fluka, Buchs, CH
Ortho-Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RotiSafe Gel Stain	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Silberniträt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Sybr Green II	Amresco, Solon, OH
TEMED	Fluka, Buchs, CH
TRIS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
TRIS/HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, DE
Trypton	Fluka, Buchs, CH
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

## A.5 Lösungen, Medien und Puffer

### Puffer

Aptamer-Bindepuffer TBSET	10 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 50 mM KCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,0
Bead-Waschpuffer	50 mM TRIS/HCl, 300 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,0
EMSA-Probenpuffer	20 mM TRIS/HCl, 0,02 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin, pH 6,8
EMSA-Laufpuffer	25 mM TRIS, 50 mM Glycin, pH 9,5
Heparin-Bindepuffer (PBST)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % Tween 20, pH 8
Heparin-Elutionspuffer	2 M NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % Tween 20, pH 8
IB-Waschpuffer A	50 mM TRIS/HCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM EDTA, 5 % Glycerin, 10 µg/mL DNase I, 0,05 % Natriumdesoxycholat, 1 % NP-40, pH 8
IB-Waschpuffer B	10 mM CHES, 1 M Harnstoff, 100 mM L-Arginin, 15 mM L-Cystein, 0,05 % Tween 20, pH 9,8
IB-Solubilisierungspuffer	10 mM CHES, 1 M Harnstoff, 100 mM L-Arginin, 15 mM L-Cystein, 0,05 % Tween 20, 10 mM DTT, pH 9,8
IMAC-Bindepuffer	300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % Tween 20, pH 8
IMAC-Elutionspuffer	300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM Imidazol, 0,05 % Tween 20, pH 8
KPP	0,17 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,72 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8
SBB	50 mM Borsäure, pH 9,0
SDS-Probenpuffer (nicht-reduz.)	20 mM TRIS/HCl, 2 mM EDTA, 5 % SDS, 5,5 % Glycerin, pH 6,8

SDS-Probenpuffer (reduzierend)	50 % 2-Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 8 % SDS, 500 mM DTT, 0,02 % Bromphenolblau
TAE	40 mM TRIS, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, pH 8,5
TGS	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Western Blot Transferpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % Ethanol, pH 8,3
Zellysepuffer	50 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3

### Medien

EGM-2	Promocell, Heidelberg, DE
LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl
LB-Agar	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose, pH 7,0
TB-Medium	1,2 % Trypton, 2,4 % Hefeextrakt, 0,4 % Glycerol, 10 % KPP

### Gellösungen

Polyacrylamid Sammelgel (6 %)	0,375 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,25 mL SDS (1 %), 0,315 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 6,8), 1,56 mL H <sub>2</sub> O, 10 µL TEMED, 25 µL APS (10 %)
Polyacrylamid Trenngel (16 %)	3 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,75 mL SDS (1 %), 2,1 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8), 1,65 mL H <sub>2</sub> O, 30 µL TEMED, 75 µL APS (10 %)
1,5 % Agarosegel	1,5 g Agarose in TAE-Puffer

### Färbelösungen

Coomassie Fixierlösung	50 % Ethanol, 20 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
------------------------	---

Coomassie-Färbelösung	0,15 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 20 % Methanol in H <sub>2</sub> O
Entfärber/Fixierer	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Farmers Reducer	0,1 % Kaliumhexacyanoferrat(III), 0,1 % Natriumthiosulfat in H <sub>2</sub> O

## A.6 Nukleinsäuresequenzen

### Aptamere

Aptamer	Sequenz
33t5	5'- CCC GTC TTC CAG ACA AGA GTG CAG GG - 3'
Del5-1	5'- ATA CCA GTC TAT TCA ATT GGG CCC GTC CGT ATG GTG GGT GTG CTG GCC AG - 3'
SL2B	5'- CAA TTG GGC CCG TCC GTA TGG TGG GT - 3'
V7t1	5'- TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG A - 3'
V7t1_14B	5'- TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG ATA GTA TGT GCA ATC - 3'
V7t1_14T	5'- TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG ATT TTT TTT TTT TTT - 3'
V7t1_12EG	5'- TGT GGG GGT GGA CGG GCC GGG TAG A /Dodecaethylenglycol/- 3'
266*	5'- TAC GAC TCA CTA TAG GGA TCC TAC GTC ATT ATG GAA ACC GAC GAA TTC CCT TTA GTG AGG GTT - 3'
Zufalls-DNA*	5'- AAA CCG CGT CTC TAC GAC CGG TGC TCG ATT TAA TTT CGC TGA CGT GA - 3'

\*als Negativkontrollen

### Primer

Gen	Forward	Reverse	Amplifikatlänge
VEGF	GGGATCTTGCACAAACAGGT	GCCTGGAATGTGTACCGACT	202
pET16b	CTTTCGGGCTTTGTTAGCAG	TCCCGCGAAATTAATACGAC	692
<i>E. coli</i> 16S rRNA	GAGCGCAACCCTTATCCT	GGTTCCCCTACGGTTAC	418

## A.7 Biomoleküle, Vektoren und Zellen

### Biomoleküle

Anti -VEGF Antikörper, Kaninchen, monoklonal, #AJ1813	Abgent, San Diego, CA
Bovines Serum Albumin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Dnase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
FCS	PAA Laboratories, Pasching, AT
GeneRuler 100 bp	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
GoTaq Polymerase	Promega, Fitchburg, WI
Hexanukleotidprimer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Myoglobin aus Pferdeherzen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Restriktionsenzym NcoI	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Restriktionsenzym XhoI	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Reverse Transkriptase, Superscript III	Life Technologies, Carlsbad, CA
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

### Vektoren

pET16b	Merck Millipore, Darmstadt, DE
--------	--------------------------------

### Zellen

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
HUVEC	Promocell, Heidelberg, DE

## A.8 Reaktionskits

### Bezeichnung

660 nm Protein Assay  
Human VEGF ELISA  
Micro BCA Protein Assay  
QIAquick Gel Extraction Kit  
RNeasy Mini Kit Plus  
Western Breeze Chromogenic  
Immunodetection Kit, Rabbit

### Bezugsquelle

Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL  
Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL  
Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL  
Qiagen Hilden, DE  
Qiagen Hilden, DE  
Life Technologies, Carlsbad, CA

# B Methoden

## B.1 Molekularbiologische Methoden

### B.1.1 Allgemeine Methoden

#### RNA-Isolation aus *E. coli*

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy MiniKit Plus nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Konzentration und die Reinheit des RNA-Extraktes spektrometrisch bestimmt.

#### Nukleinsäure-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA-Lösungen erfolgte spektrometrisch mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes

$$E_{260} = \varepsilon \cdot c \cdot d.$$

Zur Quantifizierung von Aptameren und Oligonukleotiden wurden die spezifischen, sequenzabhängigen Extinktionskoeffizienten verwendet. Für Proben mit undefinierten Nukleinsäuresequenzen wurden folgende Extinktionskoeffizienten angenommen:

$$\varepsilon_{dsDNA} = 0,02 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{RNA} = 0,025 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde per reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1 µg	RNA
3 µL	Hexanukleotidprimer (100 µM)
<i>ad</i> 21 µL	H <sub>2</sub> O
8 µL	5 × RT Puffer
4 µL	dNTP-Mix
6 µL	H <sub>2</sub> O
1 µL	Reverse Transkriptase (200 U/µL)

Zunächst wurden die RNA und Primer mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 21 µL gebracht und für 5 min auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Der Reaktionsansatz wurde für 1 min auf Eis abgekühlt, anschließend wurden alle weiteren Reaktionskomponenten zugegeben und die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 37 °C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### DNA-Gelextraktion

Zur DNA-Isolation aus einem Agarosegel wurde zunächst die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion erfolgte mittels des Qiagen Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

### Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurden 0,5 µL DNA-Template mit 5 µL 5 × Polymerasepuffer, 2 µL dNTP-Mix (2 mM) und 0,5 µL Primermix (10 µM), bestehend aus dem *forward* und *reverse* Primer, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf 25 µL aufgefüllt und 0,125 µL Taq-Polymerase wurden zugegeben. Die DNA-Amplifikation erfolgte in einem PCR-Thermocycler nach folgendem Temperaturschema:

Initiale Denaturierung	0,5 min, 95 °C
<i>30 Wiederholungen</i>	
Denaturierung	0,5 min, 95 °C
Primer-Annealing	0,5 min, 59–62 °C (Primer-abhängig)
Elongation	0,5 min, 72 °C
Abschließende Elongation	5 min, 72 °C

### Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Dazu wird die Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht und dabei gelöst. Die Lösung wird abgekühlt, kurz vor dem Erstarren mit 2 µL

RotiSafe GelStain versetzt und in die Gelkammer gegossen. Es werden 2  $\mu\text{L}$  des DNA-Standards und je 10  $\mu\text{L}$  der Genamplifikate auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Fragmente werden in TAE-Laufpuffer bei 100 V für 45 min elektrophoretisch getrennt und die Banden anschließend im Gel mit Hilfe des UV-aktiven Farbstoffs RotiSafe detektiert.

## B.1.2 Klonierung

### Restriktionsverdau und Ligation

Die Klonierung des VEGF-Gens in den Expressionsvektor pET16b erfolgte über eine *Sticky End* Klonierung mittels der Restriktionsenzyme NcoI und XhoI. Zunächst wurden in zwei getrennten Restriktionsansätzen 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 0,5  $\mu\text{g}$  Gen-Template mit je 1  $\mu\text{L}$  NcoI (10 u/ $\mu\text{L}$ ) und 1  $\mu\text{L}$  XhoI (10 u/ $\mu\text{L}$ ) in 2  $\times$  Tango Restriktionspuffer versetzt. Es wurde mit Wasser bis zu einem Volumen von 30  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und die Ansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 80 °C gestoppt.

Zur Ligation wurden der restriktionsverdaute Vektor und die Insert-DNA im Verhältnis 1:5 eingesetzt und es wurden 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Ligationspuffer sowie 1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase (5 u/ $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 20  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen aufgefüllt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### Transformation mittels Hitzeschock

Die chemisch kompetenten *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. 10  $\mu\text{L}$  Bakteriensuspension wurden mit 1  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA versetzt und 5 min lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Die Bakteriensuspension wurde sofort abgekühlt und für 2 min auf Eis gelagert. Es wurden 80  $\mu\text{L}$  SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite Repression*)-Medium zum Transformationsansatz hinzugefügt und für 45 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB (*Lysogeny broth*)-Agarplatten mit Ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt, auf neue Agarplatten überführt und per Kolonie-PCR untersucht.

### Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde mit einer sterilen Impföse die zu untersuchende Bakterienkolonie gepickt und in 50  $\mu\text{L}$  steriles Wasser überführt. Die Probe wurde für 5 min bei 95 °C gekocht, anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt und bei 12.000  $\times g$  und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde eine PCR mit folgendem Ansatz durchgeführt:

10 µL	Aufgekochte Bakterienlösung
1 µL	Primermix (10 µM)
1 µL	dNTP-Mix (2 mM)
10 µL	5 × Polymerasepuffer
0,25 µL	Taq-Polymerase
27,75 µL	H <sub>2</sub> O

Die DNA-Amplifikation erfolgte in einem PCR-Thermocycler nach folgendem Temperaturschema:

Initiale Denaturierung	0,5 min, 95 °C
<i>35 Wiederholungen</i>	
Denaturierung	0,5 min, 95 °C
Primer-Annealing	0,5 min, 59–62 °C (Primer-abhängig)
Elongation	0,5 min, 72 °C
Abschließende Elongation	5 min, 72 °C

## B.2 Proteinexpression

### Anlegen einer Gefrierkultur

In einem 100 mL Schüttelkolben wurden 20 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) mit einer Einzelkolonie *E. coli* BL21(DE3) angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurden je 500 µL Zellsuspension mit gleichem Volumen Glycerol gemischt und für 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

### Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Vorkultur wurden in einem 250 mL Schüttelkolben 100 mL TB (*Terrific Broth*)-Medium mit Carbenicillin (150 µg/mL) mit 1 mL einer Gefrierkultur angeimpft und bei 37 °C und 170 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6–1 wurden die Zellen geerntet, für 10 min bei 4000 ×g abzentrifugiert und in frischem TB-Medium resuspendiert. Die Hauptkultur wurde in einem 2 L Schüttelkolben mit 650 mL TB-Medium mit Carbenicillin (150 µg/mL) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 170 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 wurde die Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen per Zentrifugation für 5 min bei 10000 ×g geerntet und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## B.3 Proteinaufreinigung

Zunächst wurden die intrazellulären, unlöslichen Proteinaggregate isoliert und in Lösung gebracht. Die Aufreinigung des VEGF aus dem Proteinrohextrakt erfolgte mittels FPLC in zwei Chromatographieschritten, einer Metallchelatchromatographie und einer Heparin-Affinitätschromatographie. Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt.

### Proteinisolation aus *Inclusion Bodies*

Das Protokoll zur Isolation der *Inclusion Bodies* und die anschließende Solubilisierung des Proteins wurde auf Basis zweier bereits etablierter Methoden zur Aufreinigung von VEGF entwickelt [176, 177].

Zunächst wurden die Zellpellets aufgetaut, in 30 mL PBS resuspendiert und bei 6000 ×g für 15 min zentrifugiert, um Medienreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen pro Gramm Zellfeuchtmasse in 5 mL Zellysepuffer mit DNase I (10 µg/mL) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien unter Eiskühlung 3 × 30 s mit Ultraschall (90 W, 0,6 s Pulsdauer) behandelt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit zwei Volumen *Inclusion-Bodies* (IB)-Waschpuffer A (50 mM TRIS/HCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM EDTA, 5 % Glycerin, 10 µg/mL DNase I, 0,05 % Natriumdesoxycholat, 1 % NP-40, pH 8) versetzt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 6000 ×g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in IB-Waschpuffer B (10 mM CHES, 1 M Harnstoff, 100 mM L-Arginin, 5 mM EDTA, 15 mM L-Cystein, 0,05 % Tween 20, pH 9,8) resuspendiert, erneut 60 min bei 6000 ×g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde per 660 nm Assay bestimmt und der Überstand anschließend verworfen, Der Waschschrift mit IB-Waschpuffer B wurde wiederholt, bis kein Protein mehr in Lösung ging. Die Proteinaggregate aus den *Inclusion Bodies* wurden durch 30-minütige Inkubation in IB-Solubilisierungspuffer (10 mM CHES, 1 M Harnstoff, 100 mM L-Arginin, 5 mM EDTA, 15 mM L-Cystein, 0,05 % Tween 20, 10 mM DTT, pH 9,8) in Lösung gebracht. Ungelöstes Protein wurde durch Zentrifugation (90 min, 6000 ×g) abgetrennt und der Überstand abgenommen. Der Solubilisierungsschritt wurde einmal wiederholt. Abschließend wurde die Gesamtproteinkonzentration im Proteinrohextrakt per 660 nm Assay bestimmt.

### Metallchelatchromatographie

Zur Vorbereitung auf die Metallchelatchromatographie wurde der Proteinrohextrakt mit zwei Volumen IMAC-Bindpuffer (300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % Tween 20, pH 8) versetzt und verbleibende unlösliche Bestandteile der *Inclusion Bodies* mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße) abgetrennt. Die Chromatographiesäule (HisTrap FF)

wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min mit 5 Säulenvolumen mit dem Bindepuffer äquibriert und anschließend bei gleicher Flussrate mit der Proteinlösung beladen. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen Bindepuffer gespült und das gebundene Protein anschließend bei einer Konzentration von 240 mM Imidazol eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen mit 500 mM Imidazol im Bindepuffer gespült und zur Vorbereitung auf den nächsten Lauf mit 5 Säulenvolumen Bindepuffer äquibriert. Die Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE untersucht und die VEGF-haltigen Fraktionen vereinigt.

### **Heparin-Affinitätschromatographie**

Die vereinigten Elutionsfraktionen der Metallchelatchromatographie wurden mit 2 Volumen Heparin-Bindepuffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % Tween 20, pH 8) versetzt und Schwebstoffe mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße) abgetrennt. Die Heparin-Chromatographiesäule (HiTap HP Heparin) wurde bei einer Flussrate von 2 mL/min über 4 Säulenvolumen mit Bindepuffer äquibriert und anschließend bei 2 mL/min mit Proteinlösung beladen. Die Säule wurde bei 2 mL/min mit 4 Säulenvolumen Bindepuffer gespült und das gebundene Protein bei einer Konzentration von 800 mM Natriumchlorid eluiert. Anschließend wurde die Säule über 2 Säulenvolumen mit 2 M Natriumchlorid im Bindepuffer gespült und zur Vorbereitung auf den nächsten Lauf mit 2 Säulenvolumen Bindepuffer äquibriert. Die Elutionsfraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und die Proteinkonzentration in den VEGF-haltigen Fraktionen per 660 nm Assay bestimmt.

### **Umpuffern des Proteins**

Das VEGF wurde in den Experimenten zur Detektion und Aufreinigung in TBSET-Puffer (10 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 50 mM KCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,0) eingesetzt. Zum Umpuffern wurde die VEGF-haltige Lösung mit dem TBSET verdünnt und anschließend per Zentrifugalkonzentratoren mit 10 kDa Größenausschluss aufkonzentriert. Die Verdünnungs- und Konzentrationsschritte wurden wiederholt, bis der Anteil des ursprünglichen Puffers <5 % betrug. Die VEGF-Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

## B.4 Proteinanalytik

### B.4.1 Allgemeine Methoden

#### SDS-PAGE

Die Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Elektrophorese mit einem 16 % Polyacrylamidtrenngel (pro Gel: 3 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,75 mL SDS (1 %), 2,1 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8), 1,65 mL H<sub>2</sub>O, 30 µL TEMED, 75 µL APS (10 %)) und einem 6 % Sammelgel (pro Gel: 0,375 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid, 0,25 mL SDS (1 %), 0,315 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 6,8), 1,56 mL H<sub>2</sub>O, 10 µL TEMED, 25 µL APS (10 %)) aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurden die zu analysierenden Proteinlösungen mit gleichem Volumen Probenauftragspuffer (50 % 2-Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 8 % SDS, 500 mM DTT, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden unlösliche oder ausgefallene Feststoffe durch Zentrifugation (5 min, 10000 ×g) abgetrennt. Die Proben und der Proteingrößenstandard wurden auf das Gel aufgetragen und der Gellauf zunächst bei 100 V, nach Durchlaufen des Sammelgels bei 150 V durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine entweder direkt im Gel angefärbt oder per Western Blot auf eine Membran übertragen.

Für die SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen zum Nachweis von Protein-Oligomeren wurden die Proteinlösungen mit einem Probenauftragspuffer ohne Mercaptoethanol (20 mM TRIS/HCl, 2 mM EDTA, 5 % SDS, 5,5 % Glycerin) vorbereitet.

#### Kolloidale Coomassie-Färbung

Zur quantitativen Anfärbung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel unter leichtem Schwenken für mindestens 30 min in der Fixierlösung (50 % Ethanol, 20 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) inkubiert. Das Gel wurde 3 × mit Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in Coomassie-Färbelösung (0,15 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 % Methanol in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgegossen und das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes mit Wasser gewaschen.

#### Silberfärbung

Für einen sensitiveren Proteinnachweis wurde das Gel zunächst für mindestens 30 min im Entfärbler/Fixierer (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurde das Gel zweimal mit Wasser gewaschen und für 2,5 min in Farmers Reducer (0,1 % K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0,1 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Das Gel wurde mindestens 3 × für je 10 min mit Wasser gewaschen, anschließend

für 30 min in Silbernitratlösung (0,1 % Silbernitrat in Wasser) inkubiert und es wurde erneut 2 × mit Wasser und 1 × mit Natriumcarbonatlösung (2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) gewaschen. Nach Zugabe der Entwicklerlösung (0,15 % Formaldehyd in 2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung) wurden die Silberbanden bis zur gewünschten Bandenstärke entwickelt. Die Färbung wurde durch Zugabe von 5 % Essigsäure gestoppt und die Proteinbanden wurde mit einem Flachbettscanner dokumentiert.

### **Densitometrische Auswertung**

Die densitometrische Auswertung der Gele wurde mit der Software AlphaEaseFC (Alpha Innotech) durchgeführt. Die Gelbilder wurden in das Programm importiert und die Laufstrecken der einzelnen Proben markiert. Anhand der Dicke und der Intensitäten der Banden wurden die Reinheiten der aufgetrennten Proben berechnet.

### **Western Blot**

Zur spezifischen Detektion von VEGF mit Antikörpern wurde das Polyacrylamidgel nach der SDS-PAGE für 2 min im Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % Ethanol, pH 8,3) inkubiert, um SDS-Reste zu entfernen. Die PVDF-Membran wird zunächst komplett mit Ethanol benetzt und anschließend gemeinsam mit den Filterpapieren für 5 min im Transferpuffer geschwenkt. Filterpapiere, Gel und Membran werden geschichtet und in der Blotkammer werden die Proteine bei 15 V und 150 mA für 30 min auf die Membran übertragen. Anschließend wird nach Herstellerprotokoll mit dem Western Breeze Immunodetection Kit und einem VEGF-bindenden Primärantikörper (#AJ1813, Abgent) das VEGF spezifisch angefärbt.

## **B.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentration VEGF-haltiger Proben wurde je nach Probenzusammensetzung mit unterschiedlichen Methoden bestimmt: In reinen VEGF-Lösungen wurde die Gesamtproteinkonzentration per 660 nm Assay (Konzentrationsbereich 50–2000 µg/mL) oder Micro-BCA Assay (Konzentrationsbereich 2–40 µg/mL) bestimmt. VEGF-haltige komplexe Proben sowie Proben mit sehr geringer VEGF-Konzentration wurden per ELISA quantifiziert.

### **Pierce 660 nm Assay**

Der 660 nm Assay wurde nach Herstellerangaben im Mikrotiterplattenformat durchgeführt und die Absorption bei 660 nm gemessen. Die Signalintensität des jeweiligen Puffers wurde von der der Protein-haltigen Probe subtrahiert und anhand einer zuvor vermessenen VEGF-Standardreihe wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### **Micro-BCA Assay**

Der Micro-BCA Assay wurde nach Herstellerangaben im Mikrotiterplattenformat durchgeführt und die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Signalintensität des jeweiligen Puffers wurde von der der Protein-haltigen Probe subtrahiert und anhand einer zuvor vermessenen VEGF-Standardreihe wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### **VEGF-ELISA**

Der VEGF-ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu vermessende Probe wurde je nach erwarteter Proteinkonzentration mit Sample Diluent verdünnt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine VEGF-Standardreihe vermessen.

## **B.5 Zellkulturtechniken**

### **Zellpräservation**

Als Kryo-Medium wurde voll-supplementiertes Endothelial Cell Growth Medium 2 (ECGM-2, 2 % FCS, 5 ng/mL Epidermal Growth Factor, 10 ng/mL Basic Fibroblast Growth Factor, 20 ng/mL Insulin-like Growth Factor, 0,5 ng/mL VEGF<sub>165</sub>, 1 µg/mL Ascorbinsäure, 22,5 µg/mL Heparin, 0,2 µg/mL Hydrocortison) mit 10 % DMSO versetzt. Die HUVEC in Passage 2 wurden in Aliquots von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 mL Kryo-Medium bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert. Das zugesetzte DMSO verhindert dabei die Bildung von großen intrazellulären Wasserkristallen, die die Zellen während des Einfrierens zum Platzen bringen würden.

### **Revitalisierung und Zellexpansion**

Zur Revitalisierung wurden die Zellen aus dem Kryobehälter entnommen und bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad angetaut. Anschließend wurden sie mit 24 mL vortemperiertem Kulturmedium (voll-supplementiertes ECGM-2) versetzt und in eine T175 Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 21 %  $\text{O}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit für 3 Tage kultiviert. das Medium mitsamt den nicht-adhärenten Zellen abgesaugt und durch frisches  $37^\circ\text{C}$  warmes Medium ersetzt.

### **VEGF-Aktivitätstest**

Für den Aktivitätstest wurden die HUVEC in einer Dichte von 4000 Zellen pro Well in 100 µL voll-supplementiertem ECGM-2 in eine 96-Well-Platte ausgesiedelt und für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 21 %

O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und pro Well durch 100 µL ECGM-2 mit 0,2 % FCS und ohne weitere Supplemente ersetzt. Die Zellen wurden über 24 h im Minimalmedium kultiviert um verbleibende Supplemente aufzuzehren. Zur Vorbereitung der Testmedien wurde ECGM-2 mit 0,2 % FCS mit 20 ng/mL kommerziellem VEGF, 20 ng/mL des selbst produzierten VEGF und als Negativkontrolle mit gleichem Volumen Puffer versetzt. Je 4 Wells wurden mit je 100 µL der vorbereiteten Medien versetzt und für 2 oder 5 Tage kultiviert. Anschließend wurde ein Cell-Titer-Blue (CTB-Assay) durchgeführt.

### **CTB-Assay**

Der CTB-Assay basiert auf der Reduktion des blauen nicht-fluoreszierenden Farbstoffs Resazurin zum pinken fluoreszierenden Resorufin in den Mitochondrien. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist ein Maß für die metabolische Aktivität lebender Zellen und somit die Zellviabilität. In jedes Well der 96-Well-Platte wurden 10 % (10 µL) Cell-Titer-Blue-Reagenz gegeben und für 2,5 h im dunklen bei 37 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde bei einer Exzitation von 544 nm und einer Emission von 590 nm bestimmt.

## **B.6 Bestimmung von Affinitäten**

### **B.6.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay**

Zur Analyse der DNA-Proteinbindung per Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) wurden 19 µL Proteinlösung (15 µM) in TBSET mit 1 µL Cy3-modifiziertem DNA-Aptamer (40 µM) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µL Probenauftragspuffer (20 mM TRIS/-HCl, 0,02 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin, pH 6,8) hinzugefügt und die Proben auf ein 1,5 % Agarosegel in EMSA-Laufpuffer (25 mM TRIS, 50 mM Glycin, pH 9,5) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 100 V für 60 min, die Banden wurden durch Anregen des Cy3-Farbstoffs detektiert.

### **B.6.2 Mikrothermophorese**

Das Verfahren der Mikrothermophorese wurde zur Bestimmung von Bindekonstanten verschiedener Aptamere zum VEGF verwendet. Hierzu muss einer der Bindungspartner fluoreszenzmarkiert werden. Je nach Experiment wurde entweder Cy3-markierte Aptamere eingesetzt oder markiertes VEGF eingesetzt. Das VEGF wurde mit dem Monolith Protein Labeling Kit Blue-NHS (*Amine Reactive*) nach Herstellerangaben modifiziert. Zur Bestimmung der Bindeaffinität wurde jeweils die Konzentration der markierten Komponente konstant gehalten (50 nM), während der andere Bindungspartner

in einer 1:2-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 0,2–1000 nM) eingesetzt wurde. Aptamer und Protein wurden für 10 min bei 4 °C im Aptamerbindepuffer inkubiert und anschließend wurde jede Probe in eine Glaskapillare (K004 hydrophilic) geladen. Im Anschluss wurden die Proben per Monolith NT.115 MST-System bei 90 % LED-Intensität und 20 % MST analysiert. Der  $K_D$ -Wert wurde durch nicht-lineare Kurvenanpassung unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes (B.1) bestimmt.

$$K_D = \frac{C_{\text{Aptamer}} \cdot C_{\text{VEGF}}}{C_{\text{AptamerVEGF}}} \quad (\text{B.1})$$

## B.7 Aptamer-Microarrays

### B.7.1 Reverse Phase Microarray

#### Proteinimmobilisierung und Blockieren der Oberfläche

Die verwendeten Glasobjektträger (UniSart 3D Nitro, 16 pads, Sartorius) sind jeweils mit 16 Nitrocellulose-Pads beschichtet, wobei auf jedes dieser Pads ein identisches Muster aus maximal  $10 \times 10$  Proteinspots aufgebracht wurde. Jede Proteinprobe wurde als Zehnfachreplikat gespottet, so dass pro Slide maximal 10 Proteinproben gespottet wurden. Der Aufbau eines 16 Pad-Slides und das Spotmuster sind in Abbildung B.1 schematisch dargestellt.

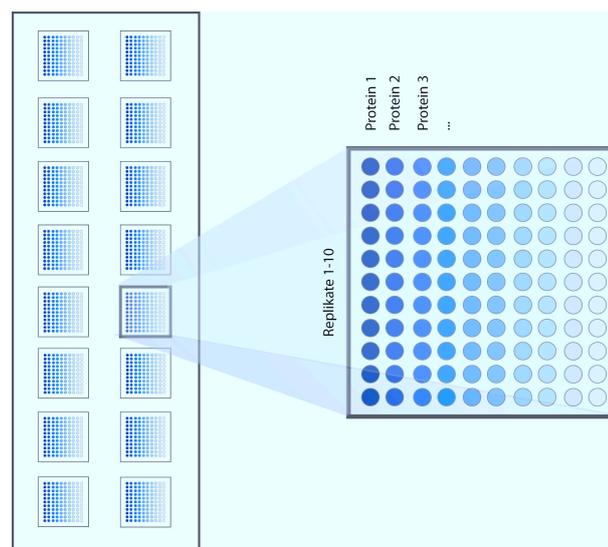


Abbildung B.1: Schematische Darstellung eines 16-Pad Microarray-Slides.

Die Proteine wurden dazu bis zur gewünschten Konzentration im Spotting-Puffer TBSET verdünnt. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur und 70 % Luftfeuchtigkeit, bei einer Spannung von 70 V und einer Frequenz von  $100 \text{ s}^{-1}$  kontaktfrei auf die Nitrocellulose-beschichteten Glasoberflächen aufgebracht. Die Anzahl der Tropfen pro Spot wurde zwischen 4 und 10 variiert. Nach der Proteinimmobilisierung wurde der Slide zunächst 30 min lang bei Raumtemperatur und 70 % Luftfeuchtigkeit getrocknet und anschließend für 45 min mit 1 % BSA (w/v) in PBS geblockt. Der Slide wurde einmal 5 min lang mit PBS, dann zweimal 5 min mit Aptamerbindepuffer gewaschen.

### Inkubation des Detektionsaptamers

Die Cy3-markierten Aptamere und Oligonukleotide wurden im Aptamerbindepuffer TBSET verdünnt. Der Slide wurde in den Inkubationsrahmen (IC-16, Schott Nexterion) eingespannt, so dass jedes Nitrocellulose-Pad von einer eigenen Inkubationskammer umgeben war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Nitrocellulosemembran nicht austrocknet. Jede dieser Kammern wurde mit 75  $\mu\text{L}$  Aptamerlösung befüllt, die Kammern wurden mit einer Klebefolie verschlossen und der Slide bei  $4^\circ\text{C}$  für 2 h oder über Nacht inkubiert. Die Aptamerlösung wurde mit einer Pipette abgenommen und der Slide  $3 \times$  für je 2 min mit 200  $\mu\text{L}$  Aptamerbindepuffer gewaschen. Anschließend wurde der Inkubationsrahmen entfernt, der Slide erneut für 2 min in 50 mL Aptamerbindepuffer gewaschen und mit Druckluft getrocknet.

### Optimierte Parameter zur Durchführung eines *Reverse Phase Microarray Assays*

Im Rahmen der Assay-Entwicklung wurden einige Parameter zur Versuchsdurchführung getestet. Die optimalen Parameter sind hier tabellarisch zusammengefasst.

<b>Technische Geräte</b>	
Microarray-Substrat	3D-Nitrocellulose (Unisart, 16 pad)
Spotting-System	Kontaktlos, per NanoPlotter NP 2.1
<b>Spotting- und Blockierungsvorgang</b>	
Spotting-Parameter	70 V, 8 Tropfen (1,6–3,2 nL) pro Spot
Spotting-Bedingungen	RT, 70 % Luftfeuchtigkeit
Spotting-Puffer	TBSET + 5 % PEG 200
Blockierungsbedingungen	1 % BSA in PBS, RT, 45 min
<b>Aptamer/Protein-Inkubation</b>	
Inkubationsbedingungen	2 h, $4^\circ\text{C}$
Inkubationspuffer	TBSET
Geeignete Detektionsaptamere	33t5; V7t1

## Detektion und Datenauswertung

Der Slide wurde mit einem Laser-Scanner (Axon 4000B) bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Laserstärke von 33 % bei unterschiedlichen PMT-Gains gescannt. Die generierten Bilder wurden mit der Software Genepix Pro 6.0 (Molecular Devices, USA) analysiert: Die Proteinspots wurden mit dem integrierten Spotmuster-Algorithmus detektiert und das mittlere Spotsignal (*Signal Mean*, SM), der Mittelwert des Hintergrundsignals (*Background Mean*, BM) und die Standardabweichung des Hintergrundsignals ( $Stabw_B$ ) ermittelt. Die relative Signalintensität wurde durch Subtraktion des mittleren Hintergrundsignals vom Mittelwert des Spotsignals berechnet. Zusätzlich wurde für jeden Spot das Signal-Rausch-Verhältnis (*Signal to Noise Ratio*, SNR) berechnet, anhand dessen das Detektionslimit bestimmt wurde. Dabei wird das Detektionslimit eines Spots durch eine minimale SNR von 3 definiert.

$$SNR = \frac{SM - BM}{Stabw_B} \quad (B.2)$$

## Bestimmung von Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Bindeaffinität von Aptamer und VEGF wurde eine Konzentrationsreihe des Detektionsaptamers mit VEGF inkubiert und die Signalintensität in Abhängigkeit von der Aptamerkonzentration aufgetragen. Die sich ergebende Sättigungskurve wurde durch nicht-lineare Kurvenanpassung unter Verwendung der Hill-Gleichung (B.3) mit  $EC_{50}$  als freiem Parameter durchgeführt.

$$SI = \frac{SI_{max} \cdot c_{Aptamer}}{K_{D^*} + c_{Aptamer}} \quad (B.3)$$

### B.7.2 Sandwich Microarray

#### Aptamerimmobilisierung auf aldehydmodifizierte Oberflächen

Zur Aptamerimmobilisierung auf Microarrays mit Aldehydgruppen wurden die aminomodifizierten Aptamere in PBS verdünnt (Konz. 0,78–50  $\mu\text{M}$ ) und kontaktfrei bei Raumtemperatur und Raumluftfeuchtigkeit auf den Microarray gespottet. Als Spotting-Parameter wurden 75 V und 6 Tropfen pro Spot gewählt. Nach der Immobilisierung wurde der Slide zunächst mindestens 2 h lang bei gleichen Bedingungen getrocknet und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur in TBSET inkubiert, um nicht abreagierte Aldehydgruppen zu blockieren. Die Glasoberfläche wurde für mindestens 1 h mit 0,5–1 % Proteinlösung geblockt, wobei sowohl BSA als auch Casein als Blockingreagenz und PBS, TBSET und

SBB als Puffer getestet wurden. Standardmäßig fand das Blockieren bei Raumtemperatur statt, es wurde jedoch auch bei 30 °C getestet. Der Slide wurde im Anschluss einmal 5 min lang mit Blockpuffer, dann zweimal für 5 min mit Aptamerbindepuffer (TBSET) gewaschen.

### **SYBR Green II Färbung**

Der mit dem Fängeraptamer bedruckte Microarray wurde zunächst für 1 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und für 1,5 min in kochendem ddH<sub>2</sub>O inkubiert, um die Sekundärstrukturen der Aptamere aufzulösen. Anschließend wurde der Objektträger per Druckluft getrocknet und für 5 min in einer SYBR Green II Färbelösung (1:10 000-Verdünnung des SYBR Green II in TAE-Puffer) inkubiert. Der Slide wurde für 2 × 3 min mit TAE-Puffer und 2 × 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss wurde der Slide per Druckluft getrocknet und per Laserscanner bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Laserintensität von 100 % gescannt.

### **Durchführung des zweistufigen *Sandwich Assays***

Zur Vorbereitung auf den *Sandwich Assay* wurden das VEGF sowie die Negativkontrollproteine im Bindepuffer des immobilisierten Fängeraptamers verdünnt. Der Slide wurde in den Inkubationsrahmen (IC-16, Schott Nexterion) eingespannt, jede Inkubationskammer mit 70 µL Proteinlösung befüllt und mit einer Klebefolie versiegelt 2 h lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung abgenommen und jede Inkubationskammer 3 × für 2 min mit je 200 µL Aptamerbindepuffer gewaschen. Das Cy3-markierte Detektionsaptamer wurde im Aptamerbindepuffer verdünnt, der Slide wurde mit je 70 µL Aptamerlösung pro Inkubationskammer beladen und erneut für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Der Slide wurde 3 × 2 min mit 200 µL Bindepuffer pro Inkubationskammer gewaschen, der Inkubationsrahmen entfernt und der Slide wurde 2 min mit 50 mL Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde der Slide per Druckluft getrocknet.

### **Durchführung des *Sandwich Assays* mit Präinkubation**

Das Cy3-markierte Detektionsaptamer und das verwendete Protein wurden in Aptamerbindepuffer verdünnt und in einem Mikroreaktionsgefäß zusammen gegeben. Die Protein-Aptamer-Lösung wurde für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend auf den Slide geladen. Es wurden je 70 µL Lösung pro Inkubationskammer aufgetragen, die Kammern wurden mit einer Klebefolie versiegelt und der Slide bei 4 °C für 2 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Slide 3 × mit je 200 µL Bindepuffer pro Inkubationskammer gewaschen und nach Entfernen des Inkubationsrahmens nochmal für 2 min mit 50 mL Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde der Slide mit Druckluft getrocknet.

## Detektion und Datenauswertung

Der Slide wurde mit einem Laser-Scanner (Axon 4000B) bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Laserstärke von 100 % bei unterschiedlichen PMT-Gains gescannt und die generierten Bilder wurden mit der Software Genepix Pro 6.0 (Molecular Devices, USA) analysiert: Die Proteinspots wurden mit dem integrierten Spotmuster-Algorithmus detektiert und das mittlere Spotsignal (Spot Mean, SM), der Mittelwert des Hintergrundsignals (Background Mean, BM) und die Standardabweichung des Hintergrundsignals (Stabw<sub>B</sub> ermittelt. relative Signalintensität wurde durch Subtraktion des mittleren Hintergrundsignals vom Mittelwert des Spotsignals berechnet. Zusätzlich wurde für jeden Spot das Signal-Rausch-Verhältnis berechnet.

## Optimierte Parameter zur Durchführung eines *Sandwich* Microarray Assays

Im Rahmen der Assay-Entwicklung wurden einige Parameter zur Versuchsdurchführung getestet. Die optimalen Parameter sind hier tabellarisch zusammengefasst.

<b>Technische Geräte</b>	
Microarray-Substrat	3D-Aldehyd, PolyAn
Spotting-System	Kontaktlos, per NanoPlotter NP 2.1
<b>Spotting- und Blockierungsvorgang</b>	
Spotting-Parameter	75 V, 6 Tropfen (1,2–2,4 nL) pro Spot
Spotting-Bedingungen	RT, Raumluftfeuchtigkeit
Spotting-Puffer	PBS
Blockierungsbedingungen	0,5 % Casein in TBSET, 30 °C
<b>Aptamer/Protein-Inkubation</b>	
Inkubationsbedingungen	Präinkubation 2 h, 4 °C, Slide-Inkubation 2 h, 4 °C
Inkubationspuffer	TBSET
Geeignete Fängeraptamere	Del5-1; V7t1
Geeignete Detektionsaptamere	Für immobilisiertes Del5-1: 33t5; SL2B; V7t1 Für immobilisiertes V7t1: Del5-1

## B.8 Aptamer-basierte Aufreinigung

### B.8.1 Auswahl geeigneter Oberflächen

Die VEGF-Adsorption an verschiedene Magnetpartikel mit Oberflächen aus Polystyrol (Dynabeads M-270 Carboxyl, Life Technologies, CA), Silan (BioMag Carboxyl, Polysciences, PA) und Agarose

(NHS Mag Sepharose, GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE) wurde untersucht. Dazu wurden zunächst je 1,5 mg der Polystyrol- und Silan-Magnetpartikel sowie 100  $\mu\text{L}$  einer Agarose-Magnetpartikelsuspension nach Herstellerangaben mit 50 mM TRIS konjugiert, um die Oberflächengruppen zu blockieren.

100  $\mu\text{L}$  der Agarose-Magnetpartikel wurde dazu zunächst in 500  $\mu\text{L}$  HCl (1 mM) für 5 min gewaschen, der Überstand abgenommen und anschließend für 60 min mit 50 mM TRIS/HCl pH 8,0 unter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Blocken der Silan-Magnetpartikel wurden diese dreimal in 50 mM Tris/HCl pH 6,0 gewaschen und in 100  $\mu\text{L}$  des Puffers resuspendiert. Es wurden 30  $\mu\text{L}$  frisch angesetztes EDC (10 mg/mL) hinzugefügt und unter Rotation bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

Zum Blocken der Polystyrol-Magnetpartikel wurden diese dreimal in 50 mM MES pH 4,8 gewaschen und dann mit 100  $\mu\text{L}$  TRIS (50 mM) in 50 mM MES pH 4,8 resuspendiert. Es wurden 30  $\mu\text{L}$  frisch angesetztes EDC (10 mg/mL) hinzugefügt und unter Rotation bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

Die geblockten Partikel wurden dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  Aptamerbindepuffer gewaschen und anschließend für 1 h bei 4 °C mit je 100  $\mu\text{L}$  reiner VEGF-Lösung (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inkubiert. Die Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  Bindepuffer gewaschen und dann in 50  $\mu\text{L}$  Bindepuffer resuspendiert. Die ursprüngliche VEGF-Lösung, der Überstand, die Waschfraktionen und die Magnetpartikelsuspension wurden mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und per SDS-PAGE analysiert.

### B.8.2 Aptamerimmobilisierung

Die Aptamere wurden auf Tosylat-aktivierte Magnetpartikel mit Polystyrol-Oberfläche immobilisiert. Dazu wurde die Aptamerlösung in 100 mM Natriumboratpuffer (SBB), pH 9,5 bis zu einer Konzentration von 1 bis 50  $\mu\text{M}$  verdünnt. 1,2 mg der Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  Natriumboratpuffer gewaschen, wobei zur Abtrennung der Partikel ein Magnetständer genutzt wurde. Anschließend wurde der Puffer entfernt, die Magnetpartikel wurden in 100  $\mu\text{L}$  Aptamerlösung resuspendiert und 70  $\mu\text{L}$  einer Ammoniumsulfatlösung (3 M in 100 mM SBB, pH 9,5) wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C unter Rotation mit Hilfe eines Überkopf-Rotators durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen, 100  $\mu\text{L}$  Blockpuffer (50 mM TRIS in 100 mM SBB pH 9,5) wurden hinzugefügt und bei 37 °C für 2 h unter Rotation inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, anschließend wurden die Magnetpartikel dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  Bead-Waschpuffer und anschließend dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  Aptamerbindepuffer gewaschen. Die Aptamerkonzentration in der Ausgangslösung, im Überstand und in allen Waschfraktionen wurde spektrometrisch bestimmt und die Immobilisierungsdichte sowie die Immobilisierungseffizienz berechnet. Die Aptamer-modifizierten Magnetpartikel wurden bis zur Verwendung bei 4 °C in Aptamerbindepuffer gelagert.

### B.8.3 Aptamer-Affinitätsaufreinigung

#### Nachweis und Optimierung der VEGF-Bindung

Die VEGF-Bindeexperimente an Aptamer-modifizierte Magnetpartikel wurden zunächst mit dem Aptamer V7t1 in mittlerer Immobilisierungsdichte von 200–300 pmol/mg Magnetpartikel durchgeführt. Je 1,2 mg der Aptamer-modifizierten Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu$ L Aptamerbindepuffer gewaschen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Magnetpartikel für 1 h mit VEGF in Bindepuffer inkubiert, anschließend mit gleichem Volumen Bindepuffer dreimal gewaschen und anschließend in halbem Volumen Bindepuffer resuspendiert. Das eingesetzte Volumen der VEGF-Lösung variierte je nach Experiment zwischen 70 und 200  $\mu$ L. Zum Nachweis der VEGF-Bindung wurden die Ausgangslösung, der Überstand, die Waschfraktionen und die Magnetpartikelsuspension per SDS-PAGE analysiert. Zur Vorbereitung der Magnetpartikelsuspension wurde diese mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Magnetpartikel per Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde auf das Gel aufgetragen. Zur Optimierung der VEGF-Bindung wurde das Experiment mit verschiedenen Spacer-Molekülen zwischen Magnetpartikel und Aptamer und bei unterschiedlichen Immobilisierungsdichten wiederholt. Zusätzlich zur Analyse per SDS-PAGE wurde die Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Fraktionen untersucht.

#### Analyse der VEGF-Elution

V7t1\_14B-modifizierten Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu$ L/mg Aptamerbindepuffer gewaschen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Magnetpartikel für 1 h mit VEGF (ca. 300  $\mu$ g/mL) in Bindepuffer inkubiert, anschließend mit gleichem Volumen Bindepuffer dreimal gewaschen und in mehrere Aliquots geteilt. Zum Vergleich verschiedener Elutionspuffer wurde jedes Aliquot dreimal für je 5 min mit je 50  $\mu$ L eines Elutionspuffer inkubiert. Nach dem letzten Elutionsschritt wurden die Magnetpartikel in 50  $\mu$ L Bindepuffer resuspendiert und alle Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration in den Fraktionen bestimmt.

#### Aufreinigung aus komplexem Proteingemisch

Zur Erstellung des komplexen Proteingemischs wurde VEGF auf eine Endkonzentration von 200  $\mu$ g/mL in 1 mg/mL FCS in Aptamerbindepuffer verdünnt. Je 1,2 mg der mit V7t1\_14B oder mit Zufalls-DNA modifizierten Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu$ L/mg Aptamerbindepuffer gewaschen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Magnetpartikel für 1 h

mit 50  $\mu\text{L}$  des komplexen Proteingemischs inkubiert, anschließend mit 100  $\mu\text{L}$  Bindepuffer dreimal gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 50  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer (TBSET + 500 mM NaCl) in drei Schritten eluiert. Alle Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert.

### **Aufreinigung aus *Inclusion-Bodies-Solubilisat***

Das *Inclusion-Bodies-Solubilisat* wurde wie in Abschnitt B.3 beschrieben gewonnen und 1:10 mit Aptamerbindepuffer TBSET verdünnt. Je 1,6 mg der V7t1\_14B- und Zufalls-DNA-modifizierten Magnetpartikel wurden dreimal mit je 100  $\mu\text{L}/\text{mg}$  Aptamerbindepuffer gewaschen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Magnetpartikel für 1 h mit 50  $\mu\text{L}$  des *Inclusion-Bodies-Solubilisats* inkubiert, anschließend mit 100  $\mu\text{L}$  Bindepuffer dreimal gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 50  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer (TBSET + 500 mM NaCl) in drei Schritten eluiert. Alle Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert.

## C Ergänzende Versuchsergebnisse

### C.1 Sequenz des VEGF-Inserts

Die folgende Sequenz wurde per Gensynthese hergestellt und über die rot markierten Restriktionschnittstellen für die Restriktionsenzym NcoI (CCATGG) und XhoI (CTCGAG) in den pET-Vektor kloniert.

```
TTGCTACCAT GGGCCATCAT CACCATCACC ATCATCATAG CAGCGGCCAT ATGCATATCG AAGGTCGTGC
CCCGATGGCG GAAGGCGGTG GTCAGAATCA CCATGAAGTG GTGAAATTCA TGGACGTGTA TCAGCGTAGC
TACTGCCATC CGATTGAAAC CCTGGTGGAC ATTTTCCAGG AATATCCGGA CGAGATTGAG TACATCTTTA
AGCCGTCATG CGTTCGGTTA ATGCGCTGTG GTGGCTGTTG CAACGATGAA GGCCTGGAAT GTGTACCGAC
TGAAGAGAGC AACATCACCA TGCAGATTAT GCGCATCAAA CCGCATCAAG GCCAGCATAT TGGGGAGATG
TCCTTTCTGC AGCACAACAA ATGCGAATGT CGCCCTAAGA AAGATCGTGC ACGTCAAGAG AATCCGTGTG
GACCATGCTC TGAACGCCGC AAACACCTGT TTGTGCAAGA TCCCCAAAACG TGTAATGCT CGTGCAAGAA
TACCGATAGT CGCTGCAAAG CCCGTCAGCT GGAAC TGAAC GAACGCACAT GTCGTTGCGA TAAACCTCGT
CGCTAAGCGG CTCGAGCACC GT
```

### C.2 Proteinsequenz des VEGF-Fusionsproteins

Die folgende Sequenz entspricht der Proteinsequenz des rekombinant hergestellten VEGF mit N-terminalem His-Tag (rot markiert) und der Faktor-Xa-Spaltstelle (grün markiert) wobei der Faktor Xa zwischen dem Arginin (R) und der darauffolgenden Aminosäure (hier Alanin, A) spaltet.

```
MGHHHHHHHH SSGHMHIEGR APMAEGGGQN HHEVVKFMDV YQRSYCHPIE TLVDIFQEYP DEIEYIFKPS
CVPLMRCGGC CNDEGLECVP TEESNITMQI MRIKPHQGQH IGEMSFLQHN KCECRPKKDR ARQENPCGPC
SERRKHLFVQ DPQTCKCSCK NTDSRCKARQ LELNERTCRC DKPRR
```

### C.3 Bestimmung der Spacer-Längen

Der 12EG-Spacer besteht aus insgesamt 12 Ethylenglycoleinheiten, von denen jede aus zwei C-O-Bindungen und einer C-C-Bindung besteht (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O). Darüber hinaus ist der Spacer über eine

Phosphatgruppe an den 3'-Terminus des Aptamers gekoppelt, wodurch zwei weitere P-O-Bindungen in die Berechnung der Spacer-Längen eingehen. Die theoretischen Bindungslängen für C-O, C-C und P-O-Bindungen betragen 0,143, 0,154 und 0,163 nm und der Bindungswinkel der sp<sup>3</sup>-hybridisierten Atome beträgt 109,5 ° [178].

Die Länge des 12EG-Spacers beträgt somit:

$$D_{12EG} = 12 \cdot (2 \cdot \sin(54,75) \cdot 0,143 \text{ nm} + \sin(54,75) \cdot 0,154 \text{ nm}) + 2 \cdot \sin(54,75) \cdot 0,163 \text{ nm} = 4,58 \text{ nm}$$

Die Berechnung der Längen der 14T und 14B-Spacer erfolgte auf Basis der Nukleotide. In einer einzelsträngigen DNA beträgt die Länge eines Adenosins 0,52 nm und die eines Thymidins 0,32 nm [179]. Da die Länge von Cytosin und Guanosinnukleotiden nicht in der Literatur beschrieben wurde, wurde eine mittlere Länge von 0,42 nm für beide Nukleotide angenommen und zur Berechnung der Länge des 14B-Spacers verwendet. Die theoretischen Längen der beiden Spacer betragen somit:

$$D_{14T} = 14 \cdot 0,52 \text{ nm} = 7,28 \text{ nm}$$

$$D_{14B} = 5 \cdot 0,52 \text{ nm} + 5 \cdot 0,42 \text{ nm} + 4 \cdot 0,32 \text{ nm} = 5,29 \text{ nm}$$

Die Bezeichnungen, Zusammensetzungen und Längen der verschiedenen Spacer sind in Tabelle C.1 zusammengefasst.

**Tabelle C.1:** Zusammensetzung und Länge der molekularen Spacer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Länge [nm]
12EG	-[CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O] <sub>12</sub> -	4,58
14T	- [T] <sub>14</sub> -	7,28
14B	- TA GTA TGT GCA ATC-	5,29

## Literaturverzeichnis

- [1] Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. In Deutschland zugelassene Arzneimittel für die personalisierte Medizin. *www.vfa.de/personalisiert*, Zugriff: 19.02.2015.
- [2] M. Famulok, J. S. Hartig, and G. Mayer. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chemical reviews*, 107(9):3715–3743, 2007.
- [3] L. Gold, N. Janjic, T. Jarvis, D. Schneider, J. J. Walker, S. K. Wilcox, and D. Zichi. Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), 2012.
- [4] D. Proske, M. Blank, R. Buhmann, and A. Resch. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(4):367–374, 2005.
- [5] J. Tang, J. Xie, N. Shao, and Y. Yan. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*, 27(7):1303–1311, 2006.
- [6] J. A. Cruz-Aguado and G. Penner. Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22):10456–10461, 2008.
- [7] C. T. Lauhon and J. W. Szostak. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *Journal of the American Chemical Society*, 117(4):1246–1257, 1995.
- [8] C. Berens, A. Thain, and R. Schroeder. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(10):2549–2556, 2001.
- [9] Y. Wang, J. Killian, K. Hamasaki, and R. R. Rando. RNA molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry*, 35(38):12338–12346, 1996.
- [10] A. Geiger, P. Burgstaller, von der Eltz, H, A. Roeder, and M. Famulok. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic acids research*, 24(6):1029–1036, 1996.
- [11] Q. Yang, I. J. Goldstein, H. Y. Mei, and D. R. Engelke. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10):5462–5467, 1998.

- [12] C.L.A. Hamula, H. Zhang, L. Le Guan, X.-F. Li, and X. C. Le. Selection of aptamers against live bacterial cells. *Analytical chemistry*, 80(20):7812–7819, 2008.
- [13] Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li, and W. Tan. Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Analytical chemistry*, 79(13):4900–4907, 2007.
- [14] A. B. Iliuk, L. Hu, and W. A. Tao. Aptamer in bioanalytical applications. *Analytical chemistry*, 83(12):4440–4452, 2011.
- [15] A. Heilkenbrinker, C. Reinemann, R. Stoltenburg, J.-G. Walter, A. Jochums, F. Stahl, S. Zimmermann, B. Strehlitz, and T. Scheper. Identification of the target binding site of ethanolamine-binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection. *Analytical chemistry*, 87(1):677–685, 2015.
- [16] J.-G. Walter and F. Stahl. Aptamere in der Biosensorik. *Chemie Ingenieur Technik*, 80(6):771–781, 2008.
- [17] T. Šmuc, I.-Y. Ahn, and H. Ulrich. Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 81-82:210–217, 2013.
- [18] S. D. Seiwert, T. Stines Nahreini, S. Aigner, N. G. Ahn, and O. C. Uhlenbeck. RNA aptamers as pathway-specific MAP kinase inhibitors. *Chemistry & Biology*, 7(11):833–843, 2000.
- [19] S. H. Jalalian, S. M. Taghdisi, Nasim Shahidi H., K., Seyedeh A. M., P. Lavaee, M. Zandkarimi, N. Ghows, M. R. Jaafari, S. Naghibi, N. M. Danesh, M. Ramezani, and K. Abnous. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 50(2):191–197, 2013.
- [20] H. Y. Kong and J. Byun. Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomolecules & therapeutics*, 21(6):423–434, 2013.
- [21] P. A. Rice and C. C. Correll, editors. *Protein-Nucleic Acid Interactions*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- [22] J. Hoinka, E. Zotenko, A. Friedman, Z. E. Sauna, and T. M. Przytycka. Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(12):i215–23, 2012.
- [23] J. R. Wyatt, J. D. Puglisi, and I. Tinoco. RNA folding: pseudoknots, loops and bulges. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 11(4):100–106, 1989.
- [24] D. R. Forsdyke. A stem-loop kissing model for the initiation of recombination and the origin of introns. *Molecular biology and evolution*, 12(5):949–958, 1995.

- [25] M. A. Keniry. Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers*, 56(3):123–146, 2000.
- [26] M. Cho, Y. Kim, S.-Y. Han, K. Min, Md A. Rahman, Y.-B. Shim, and C. Ban. Detection for folding of the thrombin binding aptamer using label-free electrochemical methods. *BMB reports*, 41(2):126–131, 2008.
- [27] X.-A. Mao and W. H. Gmeiner. NMR study of the folding-unfolding mechanism for the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *Biophysical chemistry*, 113(2):155–160, 2005.
- [28] M. Marušič, R. N. Veedu, J. Wengel, and J. Plavec. G-rich VEGF aptamer with locked and unlocked nucleic acid modifications exhibits a unique G-quadruplex fold. *Nucleic acids research*, 41(20):9524–9536, 2013.
- [29] J. A. Liberman and J. E. Wedekind. Riboswitch structure in the ligand-free state. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(3):369–384, 2012.
- [30] H. Schwalbe, J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske, and J. Wöhnert. Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(8):1212–1219, 2007.
- [31] M. P. Horvath. Chapter 5. Single-stranded Nucleic Acid (SSNA)-binding Proteins. In P. A. Rice and C. C. Correll, editors, *Protein-Nucleic Acid Interactions*, pages 91–128. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- [32] A.S.R. Potty, K. Kourentzi, Fang, H. Schuck, P., and R. C. Willson. Biophysical characterization of DNA and RNA aptamer interactions with hen egg lysozyme. *International journal of biological macromolecules*, 48(3):392–397, 2011.
- [33] H. Yu, B. Jiang, and J. C. Chaput. Aptamers can discriminate alkaline proteins with high specificity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 12(17):2659–2666, 2011.
- [34] R. Rohs, X. Jin, S. M. West, R. Joshi, B. Honig, and R. S. Mann. Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annual review of biochemistry*, 79:233–269, 2010.
- [35] J.-G. Walter, A. Heilkenbrinker, J. Austerjost, S. Timur, F. Stahl, and T. Scheper. Aptasensors for Small Molecule Detection. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 67(10), 2012.
- [36] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–822, 1990.
- [37] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968):505–510, 1990.
- [38] A. D. Ellington and J. W. Szostak. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355(6363):850–852, 1992.

- [39] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355(6360):564–566, 1992.
- [40] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz. SELEX—a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*, 24(4):381–403, 2007.
- [41] Y. Li and Y. Lu. *Functional nucleic acids for analytical applications*. Integrated analytical systems. Springer, New York, NY, ©2009.
- [42] A. Ozer, J. M. Pagano, and J. T. Lis. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 3:e183, 2014.
- [43] R. Stoltenburg, N. Nikolaus, and B. Strehlitz. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2012:415697, 2012.
- [44] G. Aquino-Jarquín and J. D. Toscano-Garibay. RNA aptamer evolution: two decades of SELEction. *International journal of molecular sciences*, 12(12):9155–9171, 2011.
- [45] S. Javaherian, M. U. Musheev, M. Kanoatov, M. V. Berezovski, and S. N. Krylov. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic acids research*, 37(8):e62, 2009.
- [46] M. Kanoatov, S. Javaherian, and S. N. Krylov. Selection of aptamers for a non-DNA binding protein in the context of cell lysate. *Analytica chimica acta*, 681(1-2):92–97, 2010.
- [47] PEPperPrint. Human Autoantibody Screening with the PEPperCHIP Autoimmune Epitope Microarray 2.0. *Application Note*, 2015.
- [48] M. Lönne, A. Lavrentieva, J.-G. Walter, and C. Kasper. Analysis of oxygen-dependent cytokine expression in human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. *Cell and tissue research*, 353(1):117–122, 2013.
- [49] P. Pavlickova, E. M. Schneider, and H. Hug. Advances in recombinant antibody microarrays. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 343(1-2):17–35, 2004.
- [50] J. LaBaer and N. Ramachandran. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Current opinion in chemical biology*, 9(1):14–19, 2005.
- [51] Y. Lee, E. Kyoung Lee, C. Yong W., T. Matsui, I.-C. Kang, T.-S. Kim, and M. H. Han. ProteoChip: a highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies. *Proteomics*, 3(12):2289–2304, 2003.
- [52] S. C. Low, R. Shaimi, Y. Thandaithabany, J. K. Lim, A. L. Ahmad, and A. Ismail. Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 110:248–253, 2013.

- [53] J.-G. Walter, F. Stahl, M. Reck, I. Praulich, Y. Nataf, M. Hollas, K. Pflanz, D. Melzner, Y. Shoham, and T. Scheper. Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD. *Engineering in Life Sciences*, page NA, 2010.
- [54] G. Zhu, M. Lübbecke, J.-G. Walter, F. Stahl, and T. Scheper. Characterization of Optimal Aptamer-Microarray Binding Chemistry and Spacer Design. *Chemical Engineering & Technology*, 34(12):2022–2028, 2011.
- [55] N.L.W. Franssen-van Hal, van der Putte, P., K. Hellmuth, S. Matysiak, N. Kretschy, and M. M. Somoza. Optimized Light-Directed Synthesis of Aptamer Microarrays. *Analytical Chemistry*, 85(12):5950–5957, 2013.
- [56] C. Bock, M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, and D. Zichi. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics*, 4(3):609–618, 2004.
- [57] J. R. Collett, E. J. Cho, J. F. Lee, M. Levy, A. J. Hood, C. Wan, and A. D. Ellington. Functional RNA microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers. *Analytical biochemistry*, 338(1):113–123, 2005.
- [58] J. R. Collett, E. J. Cho, and A. D. Ellington. Production and processing of aptamer microarrays. *Methods (San Diego, Calif.)*, 37(1):4–15, 2005.
- [59] K. Stadtherr, H. Wolf, and P. Lindner. An aptamer-based protein biochip. *Analytical chemistry*, 77(11):3437–3443, 2005.
- [60] E. J. Cho, J. R. Collett, A. E. Szafranska, and A. D. Ellington. Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets. *Analytica chimica acta*, 564(1):82–90, 2006.
- [61] J.-G. Walter, Ö. Kökpinar, K. Friehs, F. Stahl, and T. Scheper. Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein-microarray applications. *Analytical chemistry*, 80(19):7372–7378, 2008.
- [62] Y.-H. Lao, K. Peck, and L.-C. Chen. Enhancement of aptamer microarray sensitivity through spacer optimization and avidity effect. *Analytical chemistry*, 81(5):1747–1754, 2009.
- [63] Y.-C. Chang, W.-C. Kao, W.-Y. Wang, W.-Y. Wang, R.-B. Yang, and K. Peck. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9):3078–3088, 2009.
- [64] E. S. Sinitsyna, J.-G. Walter, E. G. Vlakh, F. Stahl, C. Kasper, and T. B. Tennikova. Macroporous methacrylate-based monoliths as platforms for DNA microarrays. *Talanta*, 93:139–146, 2012.

- [65] L.-C. Chen, S.-C. Tzeng, and K. Peck. Aptamer microarray as a novel bioassay for protein-protein interaction discovery and analysis. *Biosensors & bioelectronics*, 42:248–255, 2013.
- [66] M. Mascini, G. G. Guilbault, S. J. Lebrun, and D. Compagnone. Colorimetric Microarray Detection System for Ghrelin Using Aptamer–Technology. *Analytical Letters*, 40(7):1386–1399, 2007.
- [67] C. Roh, H.-Y. Lee, S.-E. Kim, and S.-K. Jo. A highly sensitive and selective viral protein detection method based on RNA oligonucleotide nanoparticle. *International journal of nanomedicine*, 5:323–329, 2010.
- [68] C. Roh and S. K. Jo. Quantitative and sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated RNA aptamer on chip. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(12):1475–1479, 2011.
- [69] M. Lübbecke, J.-G. Walter, F. Stahl, and T. Scheper. Aptamers as detection molecules on reverse phase protein microarrays for the analysis of cell lysates. *Engineering in Life Sciences*, 12(2):144–151, 2012.
- [70] R. Yamamoto-Fujita and Kumar, P. K. R. Aptamer-derived nucleic acid oligos: applications to develop nucleic acid chips to analyze proteins and small ligands. *Analytical chemistry*, 77(17):5460–5466, 2005.
- [71] J. Pultar, U. Sauer, P. Domnanich, and C. Preininger. Aptamer-antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum. *Biosensors & bioelectronics*, 24(5):1456–1461, 2009.
- [72] A. Susic, A. Meneghello, E. Cretaio, and B. Gatto. Human thrombin detection through a sandwich aptamer microarray: interaction analysis in solution and in solid phase. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 11(10):9426–9441, 2011.
- [73] A. Meneghello, A. Susic, A. Antognoli, E. Cretaio, and B. Gatto. Development and Optimization of a Thrombin Sandwich Aptamer Microarray. *Microarrays*, 1(3):95–106, 2012.
- [74] A. Susic, A. Meneghello, A. Antognoli, E. Cretaio, and B. Gatto. Development of a multiplex sandwich aptamer microarray for the detection of VEGF165 and thrombin. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(10):13425–13438, 2013.
- [75] D. Sehgal and I. K. Vijay. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Analytical biochemistry*, 218(1):87–91, 1994.
- [76] A. Ressine, I. Corin, K. Järås, G. Guanti, C. Simone, G. Marko-Varga, and T. Laurell. Porous silicon surfaces: a candidate substrate for reverse protein arrays in cancer biomarker detection. *Electrophoresis*, 28(23):4407–4415, 2007.

- [77] M. Gonzalez-Gonzalez, R. Jara-Acevedo, S. Matarraz, M. Jara-Acevedo, S. Paradinas, J. M. Sa-yagües, A. Orfao, and M. Fuentes. Nanotechniques in proteomics: protein microarrays and novel detection platforms. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 45(4):499–506, 2012.
- [78] K. Mondal and M. N. Gupta. The affinity concept in bioseparation: evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomolecular engineering*, 23(2-3):59–76, 2006.
- [79] C. Ravelet, C. Grosset, and E. Peyrin. Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers. *Journal of chromatography. A*, 1117(1):1–10, 2006.
- [80] E. N. Brody and L. Gold. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Journal of biotechnology*, 74(1):5–13, 2000.
- [81] T. S. Romig, C. Bell, and D. W. Drolet. Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 731(2):275–284, 1999.
- [82] S. Miyakawa, Y. Nomura, T. Sakamoto, Y. Yamaguchi, K. Kato, S. Yamazaki, and Y. Nakamura. Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(6):1154–1163, 2008.
- [83] S. Tsuji, T. Tanaka, N. Hirabayashi, S. Kato, J. Akitomi, H. Egashira, I. Waga, and T. Ohtsu. RNA aptamer binding to polyhistidine-tag. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(1):227–231, 2009.
- [84] B. Han, C. Zhao, J. Yin, and H. Wang. High performance aptamer affinity chromatography for single-step selective extraction and screening of basic protein lysozyme. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 903:112–117, 2012.
- [85] H. K. Lim, I.-H. Kim, H. Y. Nam, S. Shin, and S. S. Hah. Aptamer-Based Alternatives to the Conventional Immobilized Metal Affinity Chromatography for Purification of His-Tagged Proteins. *Analytical Letters*, 46(3):407–415, 2013.
- [86] M. A. Rehder and L. B. McGown. Open-tubular capillary electrochromatography of bovine beta-lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase. *Electrophoresis*, 22(17):3759–3764, 2001.
- [87] A. C. Connor, K. A. Frederick, E. J. Morgan, and L. B. McGown. Insulin capture by an insulin-linked polymorphic region G-quadruplex DNA oligonucleotide. *Journal of the American Chemical Society*, 128(15):4986–4991, 2006.
- [88] A. C. Connor and L. B. McGown. Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1111(2):115–119, 2006.

- [89] Q. Zhao, X.-F. Li, Y. Shao, and X. C. Le. Aptamer-based affinity chromatographic assays for thrombin. *Analytical chemistry*, 80(19):7586–7593, 2008.
- [90] J. Xiao, J. A. Carter, K. A. Frederick, and L. B. McGown. A genome-inspired DNA ligand for the affinity capture of insulin and insulin-like growth factor-2. *Journal of separation science*, 32(10):1654–1664, 2009.
- [91] M. B. Murphy. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic acids research*, 31(18):110e–110, 2003.
- [92] S. Cho, S.-H. Lee, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, and B.-G. Kim. Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker. *Electrophoresis*, 25(21-22):3730–3739, 2004.
- [93] H. A. Oktem, G. Bayramoglu, V. C. Ozalp, and M. Y. Arica. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. *Biotechnology progress*, 23(1):146–154, 2007.
- [94] Ö. Kökpinar, J.-G. Walter, Y. Shoham, F. Stahl, and T. Scheper. Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads. *Biotechnology and bioengineering*, 108(10):2371–2379, 2011.
- [95] J. Vanneste, W. J. Peumans, Van Damme, E. J.M., S. Darvishmanesh, K. Bernaerts, Geuns, J. M. C., and Van der Bruggen, B. Novel natural and biomimetic ligands to enhance selectivity of membrane processes for solute-solute separations: beyond nature’s logistic legacy. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(3):354–371, 2014.
- [96] K. Suck, J. Walter, F. Menzel, A. Tappe, C. Kasper, C. Naumann, R. Zeidler, and T. Scheper. Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. *Journal of biotechnology*, 121(3):361–367, 2006.
- [97] Inc Bio-Rad Laboratories. Overcoming the Cost and Performance Limitations of ELISA with Bio-Plex Multiplex Readers. *tech note 6313*, 2012.
- [98] L. Yingfu and L. Yi, editors. *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*. Springer New York, New York, NY, 2009.
- [99] S. Ylä-Herttuala, T. T. Rissanen, and Vajanto, I. Hartikainen, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(10):1015–1026, 2007.
- [100] N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 25(4):581–611, 2004.
- [101] S. J. Harper and D. O. Bates. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews. Cancer*, 8(11):880–887, 2008.

- [102] N. Ferrara, H.-P. Gerber, and J. LeCouter. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6):669–676, 2003.
- [103] B. Brandner, R. Kurkela, P. Vihko, and A. J. Kungl. Investigating the effect of VEGF glycosylation on glycosaminoglycan binding and protein unfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(3):836–839, 2006.
- [104] W. J. Fairbrother, M. A. Champe, H. W. Christinger, B. A. Keyt, and M. A. Starovasnik. Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Structure (London, England : 1993)*, 6(5):637–648, 1998.
- [105] Y. A. Muller, H. W. Christinger, B. A. Keyt, and de Vos, A M. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure (London, England : 1993)*, 5(10):1325–1338, 1997.
- [106] M. A. Starovasnik, H. W. Christinger, C. Wiesmann, M. A. Champe, de Vos, A M, and N. J. Skelton. Solution structure of the VEGF-binding domain of Flt-1: comparison of its free and bound states. *Journal of molecular biology*, 293(3):531–544, 1999.
- [107] C. Wiesmann, G. Fuh, H. W. Christinger, C. Eigenbrot, J. A. Wells, and de Vos, A M. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 91(5):695–704, 1997.
- [108] E. Stutfeld and K. Ballmer-Hofer. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life*, 61(9):915–922, 2009.
- [109] D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, and N. Janjić. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 33(34):10450–10456, 1994.
- [110] L. S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L. A. Beebe, B. D. Feistner, S. C. Gill, F. M. Jucker, and N. Janjić. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chemistry & Biology*, 2(10):683–695, 1995.
- [111] A.S.R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, G. W. Jackson, X. Zhang, G. B. Legge, and R. C. Willson. Biophysical characterization of DNA aptamer interactions with vascular endothelial growth factor. *Biopolymers*, 91(2):145–156, 2009.
- [112] L. Gold and N. Janjic. High-affinity oligonucleotide ligands to vascular endothelial growth factor (VEGF). *US patent 5811533*, 1998, NeXstar Pharmaceuticals, Inc. (Boulder, CO).
- [113] J. N. Taylor, Q. Darugar, K. Kourentzi, R. C. Willson, and C. F. Landes. Dynamics of an anti-VEGF DNA aptamer: a single-molecule study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2):213–218, 2008.

- [114] J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, and N. Janjić. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *The Journal of biological chemistry*, 273(32):20556–20567, 1998.
- [115] J.-H. Lee, M. D. Canny, A. de Erkenez, D. Krilleke, Y.-S. Ng, D. T. Shima, A. Pardi, and F. Jucker. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52):18902–18907, 2005.
- [116] P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, and A. D. Keefe. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chemistry & Biology*, 12(1):25–33, 2005.
- [117] I. Kanakaraj, W.-H. Chen, M. Poongavanam, S. Dhamane, L. J. Stagg, J. E. Ladbury, K. Kourntzi, U. Strych, and R. C. Willson. Biophysical characterization of VEGF-aHt DNA aptamer interactions. *International journal of biological macromolecules*, 57:69–75, 2013.
- [118] H. Hasegawa, K. Sode, and K. Ikebukuro. Selection of DNA aptamers against VEGF165 using a protein competitor and the aptamer blotting method. *Biotechnology letters*, 30(5):829–834, 2008.
- [119] H. Kaur and L.-Y. L. Yung. Probing high affinity sequences of DNA aptamer against VEGF165. *PloS one*, 7(2):e31196, 2012.
- [120] Y. Nonaka, K. Sode, and K. Ikebukuro. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(1):215–225, 2010.
- [121] W. Yoshida, T. Saito, T. Yokoyama, S. Ferri, and K. Ikebukuro. Aptamer selection based on G4-forming promoter region. *PloS one*, 8(6):e65497, 2013.
- [122] M. Jing and M. T. Bowser. Tracking the emergence of high affinity aptamers for rhVEGF165 during capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment using high throughput sequencing. *Analytical chemistry*, 85(22):10761–10770, 2013.
- [123] M. Kimoto, R. Yamashige, K.-I. Matsunaga, S. Yokoyama, and I. Hirao. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nature biotechnology*, 31(5):453–457, 2013.
- [124] H.-W. Meng, J. M. Pagano, B. S. White, Y. Toyoda, I. M. Min, H. G. Craighead, D. Shalloway, J. T. Lis, K. Xiao, and M. M. Jin. Discovering aptamers by cell-SELEX against human soluble growth factors ectopically expressed on yeast cell surface. *PloS one*, 9(3):e93052, 2014.

- [125] M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13):3406–3415, 2003.
- [126] I. Hyodo, T. Doi, H. Endo, Y. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Tanimizu, K. Jinno, and Y. Kotani. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *European Journal of Cancer*, 34(13):2041–2045, 1998.
- [127] Y. Li, H. J. Lee, and R. M. Corn. Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Analytical chemistry*, 79(3):1082–1088, 2007.
- [128] Y. Chen, K. Nakamoto, O. Niwa, and R. M. Corn. On-chip synthesis of RNA aptamer microarrays for multiplexed protein biosensing with SPR imaging measurements. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(22):8281–8285, 2012.
- [129] C. Mita, K. Abe, T. Fukaya, and K. Ikebukuro. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Detection Using an Aptamer and PNA-Based Bound/Free Separation System. *Materials*, 7(2):1046–1054, 2014.
- [130] K. Abe, H. Hasegawa, and K. Ikebukuro. Electrochemical Detection of Vascular Endothelial Growth Factor by an Aptamer-Based Bound/Free Separation System. *Electrochemistry*, 80(5):348–352, 2012.
- [131] N. Chelyapov. Allosteric aptamers controlling a signal amplification cascade allow visual detection of molecules at picomolar concentrations. *Biochemistry*, 45(7):2461–2466, 2006.
- [132] M. I. Shukoor, M. O. Altman, D. Han, A. T. Bayrac, I. Ocsoy, Z. Zhu, and W. Tan. Aptamer-nanoparticle assembly for logic-based detection. *ACS applied materials & interfaces*, 4(6):3007–3011, 2012.
- [133] R. Freeman, J. Girsh, A. E.-J. Jou, J.-an A. Ho, T. Hug, J. Dervedde, and I. Willner. Optical aptasensors for the analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF). *Analytical chemistry*, 84(14):6192–6198, 2012.
- [134] L. Pasquardini, S. Berneschi, A. Barucci, F. Cosi, R. Dallapiccola, M. Insinna, L. Lunelli, G. N. Conti, C. Pederzoli, S. Salvadori, and S. Soria. Whispering gallery mode aptasensors for detection of blood proteins. *Journal of biophotonics*, 6(2):178–187, 2013.
- [135] H. Cho, E.-C. Yeh, R. Sinha, T. A. Laurence, J. P. Bearinger, and L. P. Lee. Single-step nanoplasmonic VEGF165 aptasensor for early cancer diagnosis. *ACS nano*, 6(9):7607–7614, 2012.
- [136] H.-S. Lee, K. Su Kim, C.-J. K., S. K. Hahn, and M.-H. Jo. Electrical detection of VEGFs for cancer diagnoses using anti-vascular endothelial growth factor aptamer-modified Si nanowire FETs. *Biosensors & bioelectronics*, 24(6):1801–1805, 2009.

- [137] S. Zhao, W. Yang, and R. Y. Lai. A folding-based electrochemical aptasensor for detection of vascular endothelial growth factor in human whole blood. *Biosensors & bioelectronics*, 26(5):2442–2447, 2011.
- [138] J. Zhao, Xiaolin H., B. B., X. Liu, Y. Yin, and G. Li. A signal-on electrochemical aptasensor for simultaneous detection of two tumor markers. *Biosensors & bioelectronics*, 34(1):249–252, 2012.
- [139] Y. Nonaka, K. Abe, and K. Ikebukuro. Electrochemical Detection of Vascular Endothelial Growth Factor with Aptamer Sandwich. *Electrochemistry*, 80(5):363–366, 2012.
- [140] A. Qureshi, Y. Gurbuz, and J. H. Niazi. Capacitive aptamer–antibody based sandwich assay for the detection of VEGF cancer biomarker in serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209:645–651, 2015.
- [141] O. S. Kwon, S. J. Park, and J. Jang. A high-performance VEGF aptamer functionalized polypyrrole nanotube biosensor. *Biomaterials*, 31(17):4740–4747, 2010.
- [142] O. S. Kwon, S. J. Park, J.-Y. Hong, A.-R. Han, J. S. Lee, J. S. Lee, J. H. Oh, and J. Jang. Flexible FET-type VEGF aptasensor based on nitrogen-doped graphene converted from conducting polymer. *ACS nano*, 6(2):1486–1493, 2012.
- [143] J.-H. Lee, M. D. Canny, A. de Erkenez, D. Krilleke, Y.-S. Ng, D. T. Shima, A. Pardi, and F. Jucker. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52):18902–18907, 2005.
- [144] Y. Nakamura, T. Gojobori, and T. Ikemura. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic acids research*, 28(1):292, 2000.
- [145] Novagen, Merck KGaA. pET System Manual. 10th Edition, 2003.
- [146] A. Cothran, St John, R. J., C. H. Schmelzer, and S. A. Pizarro. High-pressure refolding of human vascular endothelial growth factor (VEGF) recombinantly expressed in bacterial inclusion bodies: refolding optimization, and feasibility assessment. *Biotechnology progress*, 27(5):1273–1281, 2011.
- [147] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 112:531–552, 1999.
- [148] J. Kyte and R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1):105–132, 1982.
- [149] N. Ferrara. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 280(6):C1358–66, 2001.

- [150] N. Ferrara and W. J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2):851–858, 1989.
- [151] Y. Shizukuda, S. Tang, R. Yokota, and J. A. Ware. Vascular Endothelial Growth Factor Induced Endothelial Cell Migration and Proliferation Depend on a Nitric Oxide Mediated Decrease in Protein Kinase C Activity. *Circulation Research*, 85(3):247–256, 1999.
- [152] A. Yoshida, B. Anand-Apte, and B. R. Zetter. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 13(1-2):57–64, 1996.
- [153] M. Meyer. *Applications of aptamers in flow cytometry assays*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, 2014.
- [154] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, and S. Duhr. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and drug development technologies*, 9(4):342–353, 2011.
- [155] B. Wilson, L. A. Liotta, and E. Petricoin. Monitoring proteins and protein networks using reverse phase protein arrays. *Disease markers*, 28(4):225–232, 2010.
- [156] K. Järås, A. Ressine, E. Nilsson, J. Malm, G. Marko-Varga, H. Lilja, and T. Laurell. Reverse-phase versus sandwich antibody microarray, technical comparison from a clinical perspective. *Analytical chemistry*, 79(15):5817–5825, 2007.
- [157] J. T. Bushberg. *The essential physics of medical imaging*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 3rd ed edition, 2012.
- [158] S. Handran, S. Pickett, and D. Verdnik. Key Considerations for Accurate Microarray Scanning and Image Analysis. In G. L. Kamberova and S. K. Shah, editors, *DNA array image analysis*. DNA Press, Skippack, PA, ©2002.
- [159] M. Lübbecke. *Neue Analyse- und Detektionsmethoden in der Microarray-Technologie*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, 2011.
- [160] K. Gekko and S. N. Timasheff. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry*, 20(16):4677–4686, 1981.
- [161] J. C. Lee and S. N. Timasheff. The stabilization of proteins by sucrose. *The Journal of biological chemistry*, 256(14):7193–7201, 1981.
- [162] S. E. Bondos and A. Bicknell. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical biochemistry*, 316(2):223–231, 2003.

- [163] T. Arakawa, S. J. Prestrelski, W. C. Kenney, and J. F. Carpenter. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3):307–326, 2001.
- [164] S. S. Narayanan and S. K. Pal. Nonspecific protein-DNA interactions: complexation of alpha-chymotrypsin with a genomic DNA. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(12):6712–6718, 2007.
- [165] S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignon, M. Ducher, and P. Maire. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(6):633–648, 2008.
- [166] K. A. Krohn and J. M. Link. Interpreting enzyme and receptor kinetics: keeping it simple, but not too simple. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(8):819–826, 2003.
- [167] H. Motulsky and A. Christopoulos. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, Oxford and New York, 2003.
- [168] M. Johnson. Fetal Bovine Serum. *Materials and Methods*, 2, 2012.
- [169] K. Nakanishi, T. Sakiyama, and K. Imamura. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(3):233–244, 2001.
- [170] R. M. Kramer, V. R. Shende, N. Motl, C. N. Pace, and J. M. Scholtz. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical journal*, 102(8):1907–1915, 2012.
- [171] M. Wahlgren and T. Arnebrant. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in biotechnology*, 9(6):201–208, 1991.
- [172] M. A. Firer. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3):433–442, 2001.
- [173] J. W. Shim, Q. Tan, and L.-Q. Gu. Single-molecule detection of folding and unfolding of the G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity. *Nucleic acids research*, 37(3):972–982, 2009.
- [174] A.-P. Sibler, M. Baltzinger, L. Choulier, D. Desplancq, and D. Altschuh. SPR identification of mild elution conditions for affinity purification of E6 oncoprotein, using a multivariate experimental design. *Journal of molecular recognition : JMR*, 21(1):46–54, 2008.
- [175] T. Ali Azam, A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, and A. Ishihama. Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid. *Journal of bacteriology*, 181(20):6361–6370, 1999.

- [176] G. Siemeister, B. Schnurr, K. Mohrs, C. Schächtele, D. Marmé, and G. Martiny-Baron. Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222(2):249–255, 1996.
- [177] S. A. Pizarro, J. Gunson, M. J. Field, R. Dinges, S. Khoo, M. Dalal, M. Lee, K. A. Kaleas, K. Moiseff, S. Garnick, D. E. Reilly, M. W. Laird, and C. H. Schmelzer. High-yield expression of human vascular endothelial growth factor VEGF(165) in *Escherichia coli* and purification for therapeutic applications. *Protein expression and purification*, 72(2):184–193, 2010.
- [178] *CRC handbook of chemistry and physics*. Knovel, Norwich, N.Y., 3rd electronic ed edition, 2000.
- [179] J. B. Mills, E. Vacano, and P. J. Hagerman. Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of poly(dT) and poly(dA). *Journal of molecular biology*, 285(1):245–257, 1999.

# Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BM	<i>Background Mean</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTB-Assay	<i>CellTiter Blue Assay</i>
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
FCS	Fetales Kälber Serum
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
His	Histidin
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

---

ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MP	Magnetpartikel
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTC	<i>Non Template Control</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate-buffered Saline with Tween 20</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
SBB	Sodium Borate Buffer
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SI	Signalintensität
SM	<i>Signal Mean</i>
SMFRET	<i>Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
SNR	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
SOC-Medium	<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression Medium</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
Stabw	Standardabweichung
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB-Medium	<i>Terrific Broth Medium</i>

TBSE	<i>TRIS-buffered saline with EDTA</i>
TBSET	<i>TRIS-buffered saline with EDTA and Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Triflouressigsäure
TGS	TRIS-Glycin-SDS
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Verwendung von Aptameren in diversen bioanalytischen und biomedizinischen Gebieten. . . . .	3
2.2	Einfache Sekundärstrukturen einzelsträngiger Oligonukleotide. . . . .	5
2.3	Komplexe Sekundärstrukturen einzelsträngiger Oligonukleotide. . . . .	6
2.4	SELEX-Zyklus zur Selektion von DNA-Aptameren . Modifiziert nach [35]. . . . .	8
2.5	Schematische Darstellung eines Aptamer-basierten <i>Forward Phase, Sandwich</i> und <i>Reverse Phase</i> Assays. . . . .	12
2.6	Peptid- und Proteinstruktur des VEGF-A <sub>165</sub> . . . . .	21
2.7	Thermodynamisch bevorzugte Sekundärstruktur des 33t5 berechnet mit Mfold [125].	24
2.8	Thermodynamisch begünstigte Sekundärstrukturen der Aptamere VEa5, Del5-1 und SL2B berechnet mit Mfold [125]. . . . .	25
2.9	Mögliche Sekundärstrukturen des Aptamers V7t1. . . . .	27
3.1	Schematische Darstellung der natürlichen Expression des humanen VEGF <sub>165</sub> , dessen Gensequenz unter NCBI Accession Number (Acc-No.): NM_001171626.1 verfügbar ist, sowie die rekombinante Expression in <i>E. coli</i> . . . . .	30
3.2	Sequenzalignment der natürlichen und der Codon-optimierten Gensequenzen des VEGF <sub>165</sub> . . . . .	31
3.3	Expressionsvektor zur Produktion des VEGF-His-Fusionsproteins. . . . .	32
3.4	Nachweis der erfolgreichen Hitzeschocktransformation per Kolonie-PCR. . . . .	33
3.5	Nachweis der Expression des rekombinanten VEGF-Gens in <i>E. coli</i> per PCR. . . . .	34
3.6	Nachweis des rekombinanten in <i>E. coli</i> exprimierten VEGF im Zelllysate (Lösliche Fraktion, LF) und in unlöslichen Einschlusskörpern ( <i>Inclusion Bodies</i> , IB). . . . .	35
3.7	Nachweis des VEGF in der <i>Inclusion-Bodies</i> -Fraktion per Western Blot Analyse. . . . .	36
3.8	Aufreinigung von VEGF-His-8 per Nickel-Chelatchromatographie. . . . .	38
3.9	Bestimmung der maximalen VEGF-Bindekapazität der Nickel-Chelat-Säule. . . . .	38
3.10	Aufreinigung von VEGF-His per Heparin-Affinitätschromatographie. . . . .	39
3.11	Nachweis der Dimerisierung des VEGF zum Homodimer per SDS-PAGE-Analyse. . . . .	40

---

3.12	Nachweis der biologischen Aktivität des VEGF-His-Fusionsproteins im Vergleich zu kommerziell erhältlichem VEGF per CTB-Zellviabilitätstest. . . . .	43
4.1	Nachweis der Aptamer-Protein-Bindung per EMSA. . . . .	46
4.2	Bindungskurven der VEGF-V7t1 und VEGF-Del5-1 Bindung. . . . .	47
4.3	Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit Cy3-markiertem V7t1. . . . .	48
4.4	Schematische Darstellung der Avidität zweier Quantum-Dot-gekoppelter Aptamere. . . . .	49
4.5	Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit V7t1- oder Del5-1-modifizierten Quantum Dots. . . . .	49
4.6	Bindungskurve der Interaktion von VEGF mit V7t1- und Del5-1-modifizierten Quantum Dots. . . . .	50
5.1	Schematische Darstellung eines <i>Reverse Phase</i> und eines <i>Sandwich</i> Microarrays. . . . .	51
5.2	Ablauf eines <i>Reverse Phase</i> Microarray-Experiments und Möglichkeiten zur Optimierung. . . . .	52
5.3	Einfluss der immobilisierten Proteingesamtmenge auf die SNR und Signalintensität. . . . .	54
5.4	Einfluss des Spotting-Puffers auf die Signalintensität. . . . .	56
5.5	Abhängigkeit der Signalqualität von der Inkubationsdauer und Temperatur. . . . .	57
5.6	Nachweis der Bindung des V7t1 an VEGF per <i>Reverse Phase</i> Microarray. . . . .	58
5.7	Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen zwischen V7t1 und Myoglobin durch Zusatz von 0,05 % Tween 20 zum Bindepuffer. . . . .	59
5.8	Untersuchung der Bindung von V7t1 an VEGF und Nicht-Targetproteine im <i>Reverse Phase</i> Microarray. . . . .	60
5.9	Abhängigkeit unspezifischer Bindungen des V7t1 vom Salzgehalt und pH-Wert des Bindepuffers. . . . .	60
5.10	Bindungskurven der Interaktion von VEGF mit den VEGF-bindenden Aptameren V7t1, Del5-1, 33t5, SL2B sowie dem Kontrollaptamer 266. . . . .	62
5.11	Bestimmung der optimalen Aptamerkonzentration zur Detektion von VEGF. . . . .	64
5.12	Untersuchung der Bindspezifität der Aptamere V7t1 und 33t5 gegenüber BSA, Myoglobin und $\alpha$ -Chymotrypsin. . . . .	65
5.13	Nachweisgrenzen und dynamische Bereiche der VEGF-Detektion mit den Aptameren V7t1 und 33t5. . . . .	67
5.14	Detektion von VEGF in einem komplexen Proteingemisch aus FCS. . . . .	68
5.15	Detektion von VEGF in einem komplexen Proteingemisch aus Zellysat. . . . .	69
5.16	Detektion der VEGF-Produktion per <i>Reverse Phase</i> Microarray und SDS-PAGE. . . . .	70
5.17	Abläufe der Microarray-Experimente im <i>Sandwich</i> Format. . . . .	78
5.18	Oberflächenmodifikation der verwendeten 3D-Aldehyd Microarray-Substrate. . . . .	79

---

5.19	Reaktionsschema und Nachweis der Aptamerimmobilisierung durch Färbung mit SYBR Green II. . . . .	79
5.20	VEGF-Hintergrundsignal eines ungeblockten, mit BSA geblockten und mit Casein geblockten Slides. . . . .	80
5.21	Reduktion des Hintergrundsignals durch verschiedene Bedingungen während des Blockingvorgangs. . . . .	80
5.22	Nachweis der Proteinbindung im <i>Sandwich</i> Microarray-Format mit dem Detektionsaptamer Del5-1. . . . .	80
5.23	Einfluss des Inkubationspuffers und des Experimentablaufs auf die VEGF-Detektion im <i>Sandwich</i> Microarray-Format. . . . .	81
5.24	Untersuchung verschiedener Detektionsaptamere in Kombination mit dem Fängeraptamer V7t1 (links) und Del5-1 (rechts). . . . .	81
5.25	Nachweis unspezifischer Bindungen im Präinkubations- <i>Sandwich</i> -Microarray-Assay. . . . .	81
6.1	Schematische Darstellung der Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF. . . . .	82
6.2	Aufbau und typische Oberflächenmaterialien von Magnetpartikeln. . . . .	83
6.3	VEGF-Adsorption an unmodifizierte Silica-Magnetpartikel. . . . .	84
6.4	Konjugation von carboxylmodifizierten Magnetpartikeln mit TRIS. . . . .	85
6.5	VEGF-Adsorption an verschiedene Magnetpartikeloberflächen. . . . .	86
6.6	Salzabhängige VEGF-Adsorption an Polystyrol-Magnetpartikel. . . . .	87
6.7	Magnetische Separation und VEGF-Adsorption an TRIS-geblockte Tosylat-aktivierte Polystyrol-Magnetpartikel. . . . .	88
6.8	Immobilisierung von Aptameren auf Tosylat-aktivierte Hydroxyl-Magnetpartikel. . . . .	89
6.9	Einfluss von Reaktionszeit und Aptamerkonzentration auf die Aptamerimmobilisierung. . . . .	90
6.10	Nachweis der Protein-Bindung V7t1-modifizierter Magnetpartikel per SDS-PAGE. . . . .	92
6.11	Schematische Darstellung molekularer Spacer zwischen Aptamer und Magnetpartikel. . . . .	94
6.12	VEGF-V7t1_14B-Bindung in Abhängigkeit von der eingesetzten VEGF-Konzentration. . . . .	95
6.13	Einfluss der Aptamerdichte des V7t1_14B auf die VEGF-Bindekapazität. . . . .	96
6.14	Vergleich verschiedener Pufferbedingungen zur Elution von VEGF. . . . .	98
6.15	Salzabhängige Elution von VEGF mit Natriumchlorid, . . . . .	99
6.16	VEGF-Bindekapazität der Affinitätsmatrix nach Regeneration. . . . .	100
6.17	Aptamer-basierte VEGF-Aufreinigung aus einem komplexen Proteingemisch. . . . .	101
6.18	Aptamer-basierte VEGF-Aufreinigung aus <i>Inclusion-Bodies</i> -Solubilisat. . . . .	102
B.1	Schematische Darstellung eines 16-Pad Microarray-Slides. . . . .	126

## Tabellenverzeichnis

2.1	Bereits publizierte Aptamer-basierte Microarrays zur Detektion von Proteinen. . . .	14
2.2	Publizierte Methoden zur Aptamer-basierten Affinitätsaufreinigung. . . . .	17
2.3	Publizierte SELEX-Prozesse zur Selektion VEGF-bindender Aptamere. . . . .	22
3.1	Proteinausbeute und -reinheit während der Aufreinigung des VEGF. . . . .	40
3.2	Proteineigenschaften des nativen und rekombinant exprimierten VEGF. . . . .	41
4.1	Ausgewählte VEGF-bindende DNA-Aptamere. . . . .	44
5.1	Bindeaffinität und Optimale Aptamerkonzentration zur Detektion im <i>Reverse Phase</i> Microarray. . . . .	66
6.1	Immobilisierungsdichten verschiedener Aptamere bei 10 $\mu$ M Aptamerausgangskon- zentration. . . . .	91
6.2	VEGF-Bindekapazität des Spacer-modifizierten Aptamers V7t1 nach Immobilisierung auf Magnetpartikeln. . . . .	94
7.1	Nachweisgrenzen und Spezifitäten der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Aptamer- Microarrays. . . . .	104
7.2	Kenngrößen der Proteinbindung und -elution der entwickelten Aptamer-basierten Aufreinigung von VEGF. . . . .	105
C.1	Zusammensetzung und Länge der molekularen Spacer. . . . .	135

# Mitarbeit an Experimenten

An einigen der im experimentellen Teil dieser Arbeit beschriebenen Versuche waren neben der Autorin dieser Arbeit weitere Personen beteiligt, die an dieser Stelle aufgeführt werden.

Kapitel 3.4.2	Gemeinsame experimentelle Durchführung mit	Dr. Antonina Lavrentieva
Kapitel 4.2	Experimentelle Durchführung	B. Sc. Svenja Bolten
Kapitel 4.3	Gemeinsame experimentelle Durchführung mit	Dr. Moran Jerabek-Willemsen, NanoTemper Technologies
Kapitel 6.1.2	Experimentelle Durchführung	B. Sc. Svenja Bolten
Kapitel 6.2.2	Experimentelle Durchführung	B. Sc. Svenja Bolten
Kapitel 6.2.3	Experimentelle Durchführung	B. Sc. Svenja Bolten

## Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen der Promotion wurde eine Masterarbeit zum Thema »*Aptamer-Microarrays zur Detektion des Wachstumsfaktors VEGF*«, verfasst von B. Sc. Tracy Kurth, betreut.

Dieser Masterarbeit sind die experimentellen Daten zu Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7 entnommen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Maren Lönne
Geburtsdatum	15.03.1987
Geburtsort	Beckum
Nationalität	deutsch

## Ausbildung

Seit 2011-11	<b>Promotionsstudium</b> » <i>Chemie</i> « am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover Dissertation: Neue Aptamer-basierte Strategien zur Aufreinigung und zur Detektion rekombinanter Proteine
2009-10 ... 2011-09	<b>Masterstudium</b> » <i>Life Science</i> « an der Leibniz Universität Hannover Masterarbeit: Gen- und Proteinexpression mesenchymaler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen
2006-10 ... 2009-09	<b>Bachelorstudium</b> » <i>Life Science</i> « an der Leibniz Universität Hannover Bachelorarbeit: Molekulare Grundlagen der Apoptose
2006-06	<b>Abitur</b> am Albertus-Magnus-Gymnasium, Beckum

---

**Publikationen und Kongressbeiträge**

- 2015      **Development of an Aptamer-based Affinity Purification Method for Vascular Endothelial Growth Factor**  
M. Lönne, S. Bolten, F. Stahl, T. Scheper, J.-G. Walter  
*Biotechnology Reports* (2015) 8:16–23, Research Article.
- 2014      **Aptamer-based Affinity Purification of Vascular Endothelial Growth Factor**  
M. Lönne, J.-G. Walter, F. Stahl, T. Scheper  
*34th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides 2014*, Würzburg, Germany, Vortrag.
- 2014      **Characterization and Application of a Disposable Rotating Bed Bioreactor for Mesenchymal Stem Cell Expansion**  
A. Neumann, A. Lavrentieva, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. Kasper  
*Bioengineering* (2014) 1:231–245, Research Article.
- 2014      **Aptamer-Modified Nanoparticles as Biosensors**  
M. Lönne, G. Zhu, F. Stahl, J.-G. Walter  
*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (2014) 140:121–154, Buchkapitel.
- 2013      **Application of Immobilized Aptamers in Biotechnology**  
M. Meyer, M. Lönne, J.-G. Walter, T. Scheper  
*Cost Workshop 2013*, Leipzig, Germany, Poster.
- 2013      **Investigation of immobilized Aptamer-Protein Binding by Flow Cytometry**  
M. Meyer, M. Lönne, J.-G. Walter, T. Scheper  
*Acta Manilana*, (2013) 61:51–58, Research Article.
- 2013      **Analysis of oxygen-dependent cytokine expression in human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord**  
M. Lönne, A. Lavrentieva, J.-G. Walter, C. Kasper  
*Cell and Tissue Research*, (2013) 353:117–122, Short Communication Article.
- 2013      **Aptamer-Quantum Dot Conjugates as Sensitive Detection Molecules for a Human Tumor Marker Protein**  
M. Lönne, J.-G. Walter, F. Stahl, T. Scheper  
*Dechema Frühjahrstagung 2013*, Frankfurt/Main, Germany, Poster.
- 2012      **Transcriptome analysis using next-generation sequencing**  
K.-O. Mutz, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, J.-G. Walter, F. Stahl  
*Current Opinion in Biotechnology*, (2012) 24:1–9, Review Article.

- 2012      **Aptamer-gekoppelte Detektion des Wachstumsfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>165</sup>**  
M. Lönne, J.-G. Walter, F. Stahl, T. Scheper  
*Dechema Jahrestagung 2012, Karlsruhe, Germany, Poster.*
- 2011      **GMP-conform Expansion of Umbilical Cord derived Mesenchymal Stem Cells**  
A. Lavrentieva, S. Kress, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. von Kaisenberg, R. Hass, C. Kasper  
*World Conference on Regenerative Medicine 2011, Leipzig, Germany, Poster.*
- 2011      **Expansion of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells with Regards to GMP-conform Production Process**  
A. Lavrentieva, S. Kress, A. Heilkenbrinker, M. Lönne, C. von Kaisenberg, R. Hass, C. Kasper  
*The 5th UK Mesenchymal Stem Cell (MSC) Meeting 2011, Birmingham, UK, Poster.*