

Biologische Erkennungssysteme für
small molecules **in**
biotechnologischen Anwendungen

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. Emilia Hedwig Paula Schax
geboren am 03. Mai 1987 in Biberach a. d. Riß

2016

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Carsten Zeilinger

Tag der Promotion: 09.03.2016

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Besonders schätze ich, dass er mir ein interessantes und abwechslungsreiches Thema zur Verfügung stellte und im Institut immer eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre herrschte. Es war für mich eine sehr lehrreiche Zeit aus der ich viele Erfahrungen mitnehmen werde.

Bei Herrn PD Dr. Carsten Zeilinger möchte ich mich einerseits für die gute Zusammenarbeit, die vielen Kooperationen und Ideen und andererseits für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Frank Stahl bedanke ich mich für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der Promotion und die stets offene Tür.

Dr. Johanna Walter danke ich für die vielen hilfreichen und anregenden Gespräche und die Motivationsschübe. Sie war immer meine erste Ansprechpartnerin wenn ich Fragen hatte oder Ergebnisse diskutieren wollte. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und der Hilfestellungen bei den Publikationen.

Ein besonderer Dank gilt auch dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning, Institut für organische Chemie der Leibniz Universität Hannover, der mir die potentiellen Inhibitoren für die Hitzeschockproteine zur Verfügung stellte.

Bei Martina Weiß und Martin Pähler möchte ich mich für ihre unverzichtbare Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Institutsalltags bedanken.

Ein weiterer Dank geht auch an die Studenten, die in meiner Forschung durch kleine Projekte involviert waren.

Der ganzen Arbeitsgruppe, der Aptamergruppe und besonders meinen Bürokollegen und Freunden Franzi, Mihri, Michi, Martin und Bin danke ich für die tolle Zeit am TCI. Ihr habt einen großen Anteil daran, dass ich auch schwierigere Zeiten gut überstehen konnte. Die vielen Gespräche und Aktivitäten nach der Arbeit werde ich vermissen.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden außerhalb des TCIs danke ich für deren Unterstützung in allen Lebensbereichen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freund George für seine Unterstützung, erfolgreichen Aufmunterungen und Liebe während der Promotion.

Kurzfassung

Small molecules sind niedermolekulare, organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von kleiner als 1000 Da, die in unserer Umwelt weit verbreitet sind. Ihre Herkunft kann natürlicher und synthetischer Art sein. Zu ihnen zählen unter anderem Fette, Monosaccharide, sekundäre Botenstoffe, Mykotoxine, Pestizide und Xenobiotika. Sie können einerseits negative Effekte auf den Menschen haben (z. B. Mykotoxine, Pestizide), und andererseits können sie in Form von Wirkstoffen gesundheitsfördernd sein. In beiden Fällen ist es erstrebenswert, sie zu detektieren und ihre Eigenschaften zu kennen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei verschiedene biologische Erkennungssysteme für kleine organische Moleküle entwickelt.

Zum einen dienen Hitzeschockproteine (HSPs) als Erkennungseinheit natürlichen Ursprungs für *small molecules*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Inhibitoren für die HSPs gescreent, da ihre Inaktivierung z. B. die Viabilität von Krebszellen senken könnte. Verschiedene HSPs wurden dazu nebeneinander auf einem Microarray (Protein-Chip) immobilisiert. Anschließend konnte die Wirkstoffsondierung durch eine direkte kompetitive Verdrängung eines Fluoreszenz-markierten ATPs aus der ATP-Bindetasche der Proteine durch potentielle Inhibitoren durchgeführt werden. Mit Hilfe des entwickelten Protein-Microarray ist es möglich, neue Inhibitoren, die als Wirkstoffe dienen könnten, für verschiedene HSPs parallel zu identifizieren.

Zum anderen wurden Aptamere als biologische Erkennungseinheit synthetischer Art im Gegensatz zu den HSPs verwendet. Sie wurden zur Mykotoxin Abreicherung aus Lebensmittelproben im Säulenformat eingesetzt. Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide, die auf Grund ihrer dreidimensionalen Struktur spezifisch an ein Molekül binden. Mit Hilfe des Aptamers gegen das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) konnte erfolgreich eine Abreicherung durchgeführt werden. Da OTA häufig in Getreideprodukten vorkommt, wurde als reale Probe Bier verwendet und es wurden Abreicherungsversuche durchgeführt. Das Aptamer konnte OTA in dem Medium Bier mit Einschränkungen binden. Des Weiteren wurden Aptamer-Target-Bindungsuntersuchungen mit der Microscale Thermophorese in verschiedenen Matrices (Bindungspuffer, Kaffee, Wein, Bier, Saft) realisiert.

Stichwörter: *Kleine Moleküle, Hitzeschockprotein, Aptamer, Protein-Microarray, Affinitätsabreicherung, Microscale Thermophorese*

Abstract

Small molecules are organic compounds with a molecular weight of less than 1000 Da, and are omnipresent in the environment. They are originated from natural and artificial compounds such as fats, monosaccharides, second messengers, mycotoxins, pesticides and xenobiotics. On the one hand, they may exhibit negative effects on organisms (*e.g.* mycotoxins, pesticides), and on the other hand they may be conducive to the health such as drugs or metabolites. In either case, it is desirable to detect them and investigate their properties. In this thesis, two different biological recognition systems for the detection of small organic molecules have been developed.

Initially, heat shock proteins (HSPs) were used as a naturally recognition unit and screening of HSPs inhibitors was performed since the inactivation of HSPs can, for example, reduce the viability of cancer cells. Different HSPs were immobilized parallel on a microarray and subsequently, the direct-competitive displacement of fluorescently labeled ATP from the ATP binding pocket of the HSPs was performed to screen for potential inhibitors. Using the developed protein-microarray, it is possible to identify new drug candidates for various HSPs on parallel.

Later, aptamers have been used as a biological recognition unit, which have in contrast to the HSPs a synthetic origin. They were applied for the detection and depletion of mycotoxin in food samples in a column format. Aptamers as another recognition unit are single-stranded oligonucleotides. They can bind specifically to a molecule due to their three-dimensional structure. A depletion process has been developed by applying a well-described aptamer against the mycotoxin ochratoxin A (OTA). OTA is often found in grain and grain derivatives and therefore, binding buffer and beer were used as depletion medium. The aptamer could bind OTA in beer suboptimal. Furthermore, binding studies were implemented with microscale thermophoresis in various matrices (binding buffer, coffee, wine, beer, and juice).

Keywords: *Small molecule, Heat shock protein, Aptamers, Protein-Microarray, Affinity depletion, Microscale thermophoresis*

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2013 bis Dezember 2015 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover in dem Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Die Arbeit ist eine kumulativ geschriebene Dissertation, bei der sich der Ergebnissteil aus drei wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit Erstautorenschaften zusammensetzt. Die Publikationen wurden in international anerkannten Zeitschriften veröffentlicht oder auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen in Form von Vorträgen oder Posterpräsentationen vorgestellt. Jeder Veröffentlichung im Ergebnissteil geht eine Zusammenfassung auf Deutsch voraus, sodass der Leser eine Übersicht über die einzelnen Ergebnissteile erhält. Die Nummerierung der Überschriften, der Literaturstellen, sowie der Abbildungen und Tabellen sind in dieser Arbeit fortlaufend und stimmen somit nicht mit denen in den einzelnen Publikationen in ihrer veröffentlichten Form überein. In der nachfolgenden Publikationsliste ist der geleistete prozentuale Anteil der wissenschaftlichen Arbeit angegeben.

Die Dissertation setzt sich auch folgenden Publikationen zusammen:

Kapitel 4.1, Seite 22

Emilia Schax (85%), Johanna-Gabriela Walter, Helene Märzhäuser, Frank Stahl, Thomas Scheper, David A. Agard, Simone Eichner, Andreas Kirschning, Carsten Zeilinger (2014), Microarray-based screening of heat shock protein inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 180: 1-9, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.006.

Kapitel 5.1, Seite 39

Emilia Schax (80%), Janek Neubauer, Frank Stahl, Johanna-Gabriela Walter, Thomas Scheper, Andreas Kirschning, Carsten Zeilinger (2014), Multiplex heat shock proteins microarray as a screening platform for the selection of novel drug compounds. *BioDiscovery*, 14: 1, DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.1.

Kapitel 6.1, Seite 50

Emilia Schax (90%), Maren Lönne, Thomas Scheper, Shimshon Belkin, Johanna-Gabriela Walter (2015), Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20: 1016-1025 (2015), DOI: 10.1007/s12257-015-0486-1.

Weitere Veröffentlichungen

Hermane, J., Bułyszko, I., Eichner, S., Sasse, F., Collisi, W., Poso, A., Schax, E. (10%), Walter, J.-G., Scheper, T., Kock, K., Herrmann, C., Aliuos, P., Reuter, G., Zeilinger, C. and Kirschning, A (2015), New, Non-quinone Fluorogeldanamycin Derivatives Strongly Inhibit Hsp90. *ChemBioChem*, 16: 302–311. DOI: 10.1002/cbic.201402375.

Frank Stahl, Johanna-Gabriela Walter, Emilia Schax (20%), Carsten Zeilinger, Andreas Kirschning und Thomas Scheper (2015), Passgenau ins Ziel, Modernes Wirkstoffscreening mit Target-Omics. *Unimagazin, Forschungsmagazin der Leibniz Universität Hannover*, Ausgabe 01/02, 20-23.

Buch

Emilia Schax (90%). (2015), Protein-Microarrays für die Wirkstoffentwicklung. Springer, Reihe „*BestMasters*“, ISBN 978-3-658-08803-3.

Buchkapitel

Andreas Kirschning, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Emilia Schax (20%), Thomas Scheper, Pooyan Aliuos, Carsten Zeilinger (2015), Heat Shock Protein-Based Therapies. Chapter 16: Molecular Survival Strategies of Organisms: HSP and Small Molecules for Diagnostics and Drug Development. Volume 9 of book series “Heat Shock Proteins” published by Springer, ISBN 978-3-319-17210-1.

Vorträge

Emilia Schax, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Carsten Zeilinger, Thomas Scheper (2015), Microarray-basierte Identifizierung von Inhibitoren für krankheitsrelevante Hitzeschockproteine. BioSensor Symposium, München.

Emilia Schax, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper (2015), Binding Experiments of an Aptamer to Ochratoxin A. NanoTemper Symposium, Göttingen.

Poster

Emilia Schax, Johanna-Gabriela Walter, Helene Märzhäuser, Frank Stahl, Thomas Scheper, Andreas Kirschning, Carsten Zeilinger (2013), Development of target-oriented screening systems. Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel, Hannover.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Zielsetzung	2
3.	Theorie	3
3.1.	Interaktionen von <i>small molecules</i> mit Biomakromolekülen	3
3.1.1.	Interaktionen mit Proteinen.....	3
3.1.1.1.	Am Beispiel von Hitzeschockproteinen.....	5
3.1.1.2.	Am Beispiel von Antikörpern.....	8
3.1.2.	Interaktionen mit Aptameren	9
3.1.2.1.	Am Beispiel von einem Ochratoxin A-bindenden Aptamer	12
3.1.3.	Bindungsmechanismen von Proteinen und Aptameren mit <i>small molecules</i>	16
4.	Entwicklung eines Protein-Microarrays zum Screening von potentiellen <i>small molecule</i> Inhibitoren	20
4.1.	Microarray-based screening of heat shock protein inhibitors	22
4.1.1.	Abstract.....	22
4.1.3.	Materials and methods	24
4.1.3.1.	Purification of the human HSP90 α and bacterial HtpG of <i>H. pylori</i>	24
4.1.3.2.	Direct competitive displacement assay	25
4.1.3.3.	Preparation of potential inhibitors.....	26
4.1.3.4.	Synthesis of thiophene-substituted reblastatin derivatives	26
4.1.3.5.	Analysis of potential inhibitors	27
4.1.4.	Results and discussion	27
4.1.4.1.	Development of a direct competitive protein microarray	27
4.1.4.2.	Direct competitive assay with potential inhibitors and quality validation of the microarray	30
4.1.4.3.	Quality validation of the microarray	33
4.1.4.4.	Storage stability of the protein microarray	34
4.1.5.	Conclusion	35
5.	Anwendungen mit dem entwickelten Protein-Microarray für das Screening von potentiellen <i>small molecule</i> Inhibitoren	37
5.1.	Multiplexed heat shock protein microarray as a screening platform for the selection of novel drug compounds	39
5.1.1.	Abstract.....	39
5.1.2.	Background	40
5.1.3.	Results and Discussion	40
5.1.4.	Experimental Section	45

5.1.4.1.	Preparation of geldanamycin derivatives	45
5.1.4.2.	Protein preparations	45
5.1.4.3.	Direct competitive assay	45
5.1.4.4.	Cell lysate preparation	46
5.1.4.5.	Protein labeling and binding to HSP90 α	46
6.	Aptamer-basierte Abreicherungen und Bindungsuntersuchungen von einem toxischen <i>small molecule</i>	48
6.1.	Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A	50
6.1.1.	Abstract.....	50
6.1.2.	Introduction.....	51
6.1.3.	Materials and Methods.....	53
6.1.3.1.	Chemicals and DNA oligonucleotides.....	53
6.1.3.2.	Immobilization of oligonucleotides and quantification of the aptamer-functionalized agarose gel.....	53
6.1.3.3.	Depletion, elution and quantification of OTA	54
6.1.3.4.	HPLC analysis for OTA/OTB quantification	55
6.1.3.5.	Investigation of aptamer immobilization and functionality	55
6.1.3.6.	Microscale thermophoresis experiments.....	56
6.1.4.	Results and Discussion	56
6.1.4.1.	Depletion of OTA with an aptamer clean-up column.....	56
6.1.4.2.	Reuse of the aptamer column.....	57
6.1.4.3.	Investigation of the location of immobilized aptamer within the affinity matrix	58
6.1.4.4.	Optimization of process parameters and investigation of specificity	60
6.1.4.5.	Applicability to complex samples/real samples.....	62
6.1.4.6.	Determination of K_D values of the aptamer in complex samples.....	63
6.1.5.	Conclusion	65
7.	Zusammenfassung und Ausblick	67
	Supplemental Material	72
	Literatur.....	77
	Abkürzungsverzeichnis	85
	Abbildungsverzeichnis	87
	Tabellenverzeichnis.....	89
	Lebenslauf	90

1. Einleitung

Laut Weltgesundheitsorganisation erkrankten im Jahr 2014 weltweit 14 Millionen Menschen neu an Krebs und die Zahl soll in den nächsten Jahren weiter steigen. Bisherige Therapiemöglichkeiten sind häufig Chemo- oder Strahlentherapien, die sehr belastend für den Betroffenen sind. Ein möglicher neuer Ansatzpunkt zur Bekämpfung von Krebs sind die Hitzeschockproteine (HSPs). HSPs sind Chaperone (*engl.* Anstandsdamen), die andere unreife Proteine in den Zellen richtig falten, besonders unter extremen Bedingungen, wie hohen Temperaturen. Es ist erwiesen, dass HSPs in Krebszellen vermehrt vorkommen und auch Krebsproteine stabilisieren. Somit wird durch sie die Entwicklung von einem Tumor unterstützt. Das Ziel ist es *small molecules* (niedermolekulare Verbindungen) zu finden, die die Chaperone inhibieren, sodass sie nicht mehr zur Stabilisierung Tumor-assoziiierter Proteine beitragen. Mit Hilfe eines Screening könnten potentielle *small molecule* Wirkstoffe getestet werden. Die HSPs werden dafür als biologische Erkennungssysteme natürlichen Ursprungs auf einem Microarray immobilisiert. Microarrays bieten eine kostengünstige Lösung für Wirkstoff-Screenings, da auf einen Chip mehrere Proteine immobilisiert und somit parallel und miniaturisiert analysiert werden können.

Krebs kann auch unter extremen Umständen durch Toxine in unseren Lebensmitteln ausgelöst werden. Toxine können durch Pilze, Bakterien und Pflanzen gebildet werden oder sie können toxische Metalle bzw. Metallverbindungen sein. Da es sich bei den Toxinen unter anderen um *small molecules*, mit einem Molekulargewicht von kleiner als 1000 Da, handeln können, sind sie schwer zu detektieren. In kleineren Mengen können Toxine in der Nahrung Lebensmittelvergiftungen auslösen und bei einer Aufnahme über einen längeren Zeitraum können sogar chronische Erkrankungen entstehen. So kann z. B. das Ochratoxin A der Schimmelpilzarten der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus*, das vor allem in getreidebasierten Produkten vorkommt, Nierenerkrankungen auslösen. Eine Detektion und eventuelle Abreicherung der Toxine in Lebensmittel ist erstrebenswert. Als mögliche biologische Erkennungssysteme synthetischer Art können Aptamere dienen. Sie sind einzelsträngige Oligonukleotide, die *small molecules* über ihre dreidimensionale Struktur spezifisch und mit einer hohen Affinität binden können.

Wie bei diesen gezeigten Beispielen spielen *small molecules* auch bei vielen anderen Krankheiten eine bedeutende Rolle. Sie können einerseits negative Effekte auf den Menschen haben wie z. B. die Mykotoxine, und andererseits können sie in Form von Wirk-

stoffen gesundheitsfördernd sein. In beiden Fällen ist es erstrebenswert, sie mit Proteinen oder Aptameren als biologische Erkennungssysteme zu detektieren und ihre Eigenschaften zu kennen.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Einbindung biologischer Erkennungssysteme für *small molecules* in verschiedenen biotechnologischen Anwendungen. Hierzu ist die Arbeit in zwei Teile gegliedert. Zum einen sollen als biologische Erkennungssysteme Proteine zur Wirkstoffsondierung verwendet werden und zum anderen Aptamere zur Abreicherung eines organischen Mykotoxins.

Es soll ein miniaturisierter kompetitiver Protein-Microarray zum Screening von potentiellen Wirkstoffkandidaten weiter entwickelt werden. Als Modellproteine sollen zunächst bakterielle, humane und pflanzliche Proteine der HSP-Familie verwendet werden. Anschließend soll der Microarray auf Krebszelllysate übertragen werden, um in der Zukunft eine personalisierte Diagnostik entwickeln zu können. Die potentiellen Inhibitoren stellt das Institut für Organischen Chemie der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung.

Im zweiten Teil der Arbeit soll exemplarisch eine Aptamer-basierte Abreicherung von Mykotoxin-Kontaminationen in Lebensmitteln gezeigt werden. Es sollen Vorteile aber auch Limitierungen von Aptameren als alternative Erkennungssysteme identifiziert werden. Das in der Literatur gut beschriebene Aptamer gegen das Mykotoxin Ochratoxin A der *Aspergillus* und *Penicillium* Stämme soll als Modelaptamer in diesen Versuchen dienen. Neben den Abreicherungsversuchen, sollen auch Bindungsuntersuchungen in verschiedenen komplexen Medien durchgeführt werden.

3. Theorie

Small molecules sind niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 Da. Es handelt sich dabei um organische Verbindungen wie Fette, Monosaccharide, sekundäre Botenstoffe, Metaboliten, Medikamente, Xenobiotika, sowie Mykotoxine und Pestizide. Sie grenzen sich durch ihr Molekulargewicht von den Proteinen und anderen größeren Biomolekülen wie Zellen ab. Viele *small molecules* können die Zellmembran passieren. Sie kommen unter anderem in der Lebensmittelwissenschaft als Energiespeicher oder Pestizide, in der Molekularbiologie und Medizin als Wirkstoffe und in den Zellen als Signalmoleküle oder Toxine vor [1]. Neben gesundheitlich fördernden Substanzen wie Nähr- und Wirkstoffe, können sie aber auch kanzerogene und teratogene Wirkungen haben. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt einerseits auf Wirkstoffen und andererseits auf Toxine als exemplarischen Vertretern der Klasse der *small molecules*.

3.1. Interaktionen von *small molecules* mit Biomakromolekülen

3.1.1. Interaktionen mit Proteinen

Proteine sind Makromoleküle, die aus 20 verschiedenen überwiegend L-Aminosäuren aufgebaut sein können und machen einen großen Anteil in der Zelle aus (18% der Zelltrockenmasse) [2]. Sie sind in ihrer Sequenz, ihrer Struktur und Funktion sehr vielfältig und können in verschiedene Gruppen auf Grund ihrer Funktion eingeteilt werden:

- Rezeptoren oder Ionenkanäle: Diese Proteine sind für die Zellkommunikation zwischen und in den Zellen zuständig. Ionenkanäle lassen Ionen oder *small molecules* durch die Membranen hindurch treten. Durch sie werden unter anderem die Ionenkonzentration, der Hormonspiegel und die Anwesenheit von Neurotransmittern in der Zelle reguliert.
- Enzyme: Sie katalysieren verschiedene anabolische und katabolische Reaktionen in der Zelle und werden auf Grund dessen in sechs Hauptgruppen unterteilt (Oxidoreduktasen, Hydrolasen, Transferasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen). Die Substrate der Enzyme sind häufig *small molecules*.
- Gerüst- oder Stützsubstanzen: Dazu gehören Proteine, die im Bindegewebe, in den Muskeln, Knochen und Haaren vorhanden sind, z. B. Kollagen, Elastin, Myosin und Fibrinogen.

- Antikörper/Abwehrstoffe: Die Immunoglobuline spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem bei der Abwehr von Organismus-fremden Substanzen. Sie werden in verschiedene Klassen eingeteilt (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM). Außerdem bestehen Toxine von Insekten, Tieren oder Pflanzen oft aus Proteinen. Im Gift der Biene ist z. B. das Polypeptid Melittin enthalten.
- Transportproteine: Diese Proteine bilden mit DNA, RNA, Kohlenhydraten oder kleinen Molekülen (z. B. Sauerstoff) Komplexe aus und transportieren sie z. B. in der Zelle [2, 3].

Bei fast allen Funktionen und Aufgaben von Proteinen sind *small molecules* als Energielieferant oder Target beteiligt. Besonders bedeutend sind *small molecules* bei den Ionenkanälen bzw. Rezeptoren und Enzymen. Diese Proteine sind deshalb beliebte Wirkstoff-Targets. Der Unterschied zwischen Rezeptoren/Ionenkanälen und Enzymen ist, dass die ersteren die *small molecules* nicht verändern, wohingegen Enzyme Bindungen aufbauen oder spalten.

Enzyme werden häufig zur Krankheitsbekämpfung inhibiert. Der Inhibitor kann die Affinität des Enzyms zum Substrat senken oder er kann bewirken, dass weniger aktives Enzym in der Zelle vorhanden ist. Die Bindung des Inhibitors kann kompetitiv, nicht-kompetitiv und irreversibel erfolgen. Bei der kompetitiven Inhibierung konkurrieren das Substrat und der Inhibitor um die Bindungsdomäne des Enzyms. Ein klassisches Beispiel für die selektive kompetitive Inhibierung ist die Inhibierung der bakteriellen Peptidoglykan-Transacylase durch Penicilline oder Cephalosporine zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen. *Small molecules* Inhibitoren binden das Enzym irreversibel an der Oberfläche und sind meistens nicht selektiv, Iodacetamid oder 4-Chlormercuribenzoessäure sind Beispiele dafür. Diese Inhibitoren werden meistens nur *in vitro* z. B. zur Sterilisation verwendet und auf Grund ihrer unspezifischen Bindung nicht als Wirkstoffe eingesetzt. Nicht-kompetitive Inhibitoren binden außerhalb der Bindedomäne des Enzyms, da sie dem Substrat nicht ähnlich sind. Durch ihre Anwesenheit wird die Enzymaktivität gesenkt, ein Beispiel dafür ist Digitoxin aus den Blättern des Fingerhutes. Es bindet an die membranständige Natrium-Kalium-ATPase der Herzmuskelzellen und inhibiert die Migrationen von Natriumionen [3].

Proteinrezeptoren sind eine weitere wichtige Gruppe der Wirkstofftargets. Der *small molecule* Wirkstoff kann als Agonist oder Antagonist an die Rezeptoren binden. Als Agonist aktiviert der Wirkstoff die Signaltransduktion in der Zelle, wohingegen er als

Antagonist die Funktion des Rezeptors blockiert. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden die größte Gruppe der Rezeptoren beim Menschen (> 2000) und sie nehmen eine besondere Schlüsselrolle in der Medizin ein, da viele Wirkstoffe an sie binden [4]. So binden zum Beispiel die Betablocker als Antagonisten an die β_1 -Adrenozeptoren, rufen dadurch eine Entspannung der peripheren Blutgefäße hervor und senken dadurch die Herzfrequenz. Propranolol war der erste Betablocker, der als Wirkstoff gegen Bluthochdruck eingesetzt wurde. Aufgrund der vielen erfolgreichen entwickelten Wirkstoffe, die mit Proteinen interagieren, wird stetig nach weiteren *small molecule* Wirkstoffen gesucht [5].

3.1.1.1. Am Beispiel von Hitzeschockproteinen

Hitzeschockproteine (HSPs) sind molekulare Chaperone mit einer enzymatischen Aktivität, die anderen Proteine (ihre Klientenproteine) unter Verbrauch von ATP bei der posttranslationalen Faltung und Reifung unterstützen. Sie sind besonders unter extremen Stresssituationen, wie hohen Temperaturen, UV-Strahlung, Mangel an Sauerstoff oder in Anwesenheit von Schwermetallen bzw. Ethanol aktiv, damit die Klientenproteine nicht aggregieren oder denaturieren. Das Proteom, die Gesamtheit aller Proteine in Lebewesen, muss in gewissen Grenzen stabil gehalten werden, damit die Zellen ihre physiologische Funktion behalten [6, 7].

HSPs sind eine wichtige Zielstruktur zur Bekämpfung von Krebs, Pathogenen und Krankheiten, wie Malaria, Alzheimer oder Bakterien. Es ist erwiesen, dass die Konzentration an HSPs in Krebszellen erhöht ist und die HSPs auch fälschlicherweise Onkoproteine stabilisieren. Somit wird durch sie die Entwicklung eines Tumors unterstützt [8, 9]. Das Ziel ist es Hemmstoffe zu finden, die die Chaperone inhibieren, wenn diese in kanzerogenen Zellen Onkoproteine bei ihrer Reifung stabilisieren.

Die HSPs lassen sich auf Grund ihrer Molekülmasse, ihres genetischen und biochemischen Hintergrundes in fünf Familien einteilen (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, kleine HSPs) [8]. Proteine der HSP90-Familie, mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, kommen am häufigsten in den Zellen der Eukaryoten und Prokaryoten vor. Die eukaryotische HSP90-Familie besteht aus zwei cytosolischen Proteinen, der induzierbaren Form HSP90 α und der konstitutiven Form HSP90 β , dem Grp94 (*glucose-regulated protein*) im Endoplasmatischen Retikulum und dem TRAP1 (*tumor necrosis factor receptor associated protein 1*) im Mitochondrium. In den Chloroplasten der Pflanzen existiert die weitere

Unterfamilie. In den Prokaryoten wird das HSP mit einem Molekulargewicht von 90 kDa HtpG (*heat shock protein G*) genannt.

Die Proteine der HSP90-Familie unterliegen alle einer ähnlichen ATP-induzierten Konformationsänderung, damit sie Proteine falten, transportieren oder zu einem Multiproteinkomplex zusammen fügen können. Die Unterfamilien unterscheiden sich in ihren Klientenproteinen und Co-Chaperonen [7, 9, 10].

Die HSP90 Chaperone sind Homodimere und die einzelnen Monomere sind aus drei Domänen aufgebaut. Sie bestehen aus der N-terminalen (25 kDa), der mittleren (55 kDa) und der C-terminalen Domäne (10 kDa) (siehe Fig. 3.1). Zwischen der mittleren und der N-terminalen Domäne befindet sich eine unstrukturierte Linker-Region. Die N-terminale Domäne bindet das ATP/ADP in der ATP-Bindetasche durch Konformationsänderung des Nukleotiddeckels (*lid*). An die mittlere Domäne und die Linker-Region binden die Klientenproteine und Co-Chaperone und die C-terminale Domäne besitzt die Dimerisierungsdomäne. Mit der C-terminalen Domäne können auch ATP und Co-Chaperone interagieren [11, 12].

Mit Hilfe der Chaperone in den Zellen wird das Proteostasis Netzwerk in humanen Zellen, das aus 800 Proteinen besteht, aufrechterhalten. Proteostasis ist ein Kunstwort aus *protein* und *homeostasis*. Die Chaperone und Co-Chaperone machen in dem Proteostasis Netzwerk einen Anteil von 22% aus [13]. In Krebszellen wird versucht das, Netzwerk durch die Inhibierung des HSP90 α mit Hilfe von *small molecules* zu stören und eine Ausbreitung des Tumors zu verhindern. Ein bekannter Inhibitor ist das Ansamycinantibiotika Geldanamycin, das von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* hergestellt wird.

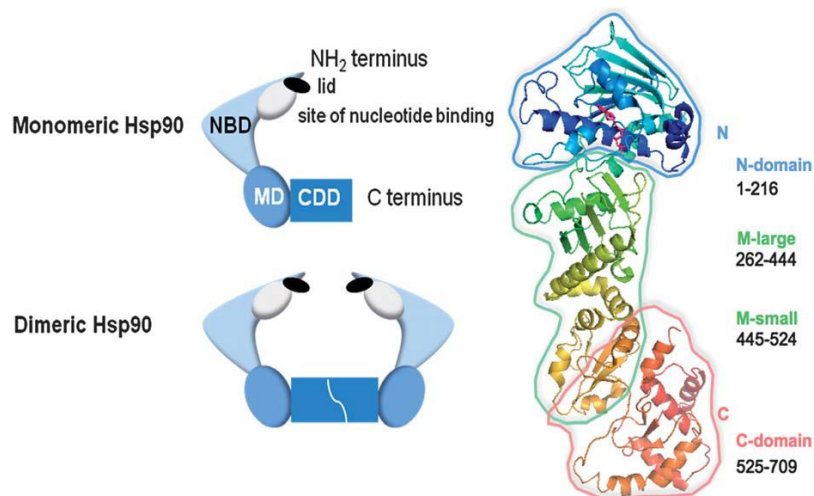


Fig. 3.1 Graphische Darstellung des Hsp90 mit seinen Domänen als Monomer und Dimer (links); Kristallstruktur eines HSP90 Monomers aus Hefe in seiner ATP gebundenen Form. NBD: N-terminale Nukleotide Bindungsdomäne, MD: Mittlere Domäne, CDD: C-terminale Dimerisierungsdomäne [12].

Das Geldanamycin bindet mit einer 100x höheren Affinität als das ATP an die N-terminale ATP-Bindedomäne und behindert dadurch die ATP-Bindung. Das HSP ist in seiner ADP- bzw. Geldanamycin-gebundenen Form inaktiv und es können keine Klientenproteine des HSPs gefaltet werden [14].

Weitere *small molecules*, die die ATP-Bindedomäne blockieren können, sind die Geldanamycin-Derivate 17-AAG, 17-DMAG, IPI-504 [15], Radicicol, das aus den Pilzen *Monocillium nordinii* und *Monosporium bonorden* isoliert wurde [16], sowie PU-H71 [17] (die Molekülstrukturen sind in der Fig. 4.1 auf Seite 29 dargestellt). PU-H71 ist ein synthetisch hergestellter Inhibitor, dessen Struktur auf Purin basiert. Der Vorteil des PU-H71 anti-HSP90 Inhibitors ist, dass er spezifisch an maligne Zellen bindet und nur eine minimale Toxizität gegenüber gesunden Zellen aufweist. In Tumorzellen bildet HSP90 bevorzugt einen Multi-Chaperon-Komplex aus, an den bestimmte Inhibitoren mit einer höheren Affinität binden, als an das unkomplexierte, latente HSP90 in gesunden Zellen. Wie 17-AAG und IPI-504 wird auch er in den klinischen Phasen untersucht [17]. Eine weitere mögliche Bindungsstelle für HSP-Inhibitoren ist die C-terminale Dimerisierungsdomäne. Ein natürlich vorkommender Inhibitor für diese Domäne ist Novobiocin, ein Aminocoumarin Antibiotika des *Streptomyces niveus*. Die Bindung von Novobiocin an das HSP ist aber sehr schwach und wurde noch nicht im Detail erforscht. Es wird vermutet, dass sich an der C-terminalen Domäne eine weitere ATP-Bindestelle befindet [12, 18].

Eine dritte Möglichkeit das HSP zu inhibieren ist die Blockierung der Co-Chaperone Bindestelle durch die Naturstoffe Gedunin oder Celastrol, die beide aus Pflanzen isoliert wurden. Durch die gebundenen Inhibitoren degradieren die Klientenproteine des HSP90, da das Chaperone diese nicht mehr richtig falten kann. In *in vitro* Versuchen wurden bereits antiproliferative Aktivitäten nachgewiesen [19].

Um HSP-Inhibitoren zur Krebsbekämpfung *in vivo* anwenden zu können, müssen sie eine hohe Target-Spezifität und Effektivität aufweisen. Außerdem müssen die Wasserlöslichkeit, die Stabilität und viele weitere Eigenschaften des potentiellen Wirkstoffes berücksichtigt werden. Bisher befinden sich einige potentielle Inhibitoren, die von den Molekülstrukturen von Geldanamycin oder Radicicol abgeleitet sind, in den klinischen Phasen I-III. Es existiert aber noch kein HSP90-Inhibitor auf dem kommerziellen Markt [12].

Um große *small molecule* Bibliotheken nach potentiellen Leitstrukturen oder Inhibitoren zu durchsuchen, werden automatisierte Screeningmethoden wie das Hochdurchsatzscreening (HTS) benötigt. Damit auch die Toxizität, die Membranpermeabilität und die Löslichkeit der potentiellen Kandidaten berücksichtigt wird, werden die HTS-Methoden zurzeit im 96-well Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Das Substrat ist dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einen radioaktiven Molekül gekoppelt und es werden Zell-basierte, kompetitive Rezeptor Bindungs- oder Funktionsassays angewendet [20, 21]. Die Zahl der zu testenden Moleküle und die Kosten für einen einzigen Bioassay (\$5 pro *well*) sind zu hoch, um sie in 96-well-Mikrotiterplatten zu testen. Es wird nach miniaturisierten Formaten gesucht, sodass mehr als 100.000 *small molecules* an einem Tag kostengünstig gescreent werden können. Eine Möglichkeit wären 384- oder 1536-well-Mikrotiterplatten [22] oder Microarrays, auf den mehrere Liganden und Targets parallel und miniaturisiert analysiert werden könnten.

3.1.1.2. Am Beispiel von Antikörpern

Antikörper sind extrazelluläre Proteine, die zu den Immunglobulinen gehören und von den B-Lymphozyten der Wirbeltiere gebildet werden. Sie haben eine Y-förmige Grundstruktur und sind aus zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut. Am N-Terminus besitzen sie hypervariable Regionen, die für die spezifische Bindung des Zielmoleküls zuständig sind. Diese Domänen werden als Antigen-Bindedomänen bezeichnet. Antigene können Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide und Polymere, seltener auch Lipide oder Nukleinsäuren sein. Die Antigene können an der Oberfläche von Viren, Bakterien, Zellen, Pilzen, Proteinen oder frei in Lösung vorliegen [2, 23]. Gelangt eine Organismusfremde Substanz oder ein Erreger in den Blutkreislauf eines Wirbeltieres, wird eine Immunantwort ausgelöst.

Small molecules wie Pestizide, Wirkstoffe oder Toxine sind nicht immunogen und können nicht von den Antikörpern erkannt werden. Sie werden Haptene genannt und sind meistens reaktive und elektrophile Substanzen. Der Begriff „Hapten“ wurde von Landsteiner und Jacobs 1936 eingeführt. Es leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „befestigen, anheften“. Nur die chemisch reaktiven Haptene können an ein körpereigenes Carrier-Moleküle wie z. B. Proteine kovalent binden und können als Carrier-Hapten-Komplexe eine Immunantwort auslösen [24]. Die bekanntesten Haptene sind die Gruppe der Urushiole der Pflanze kletternder Giftsumach (Giftefeu), die durch eine Oxidation auf

der Haut zu Chinon-Intermediate reagieren. Diese sind dann in der Lage sich an Proteine der Hautzellen zu binden und eine Immunantwort auszulösen [25].

Mit Hilfe von Carrier-Hapten-Komplexen können auch gezielt Antikörper gegen *small molecules* rekombinant generiert werden, die natürlicherweise immunogen sind. Als Carrier-Proteine eignen sich z. B. Albumine (Rinderalbumin, Ovalalbumin) oder Globuline (Immunoglobulin, Thyroglobulin). Bei der Synthese von den Hapten-Protein-Konjugaten muss die Haptendichte auf dem Protein genau bestimmt sein, nur so ist eine variationsarme Reproduktion der Antikörper möglich. Des Weiteren verbessert eine höhere Dichte des Haptene die Stärke und die Spezifität der Immunantwort [26]. Die synthetisierten Hapten-spezifischen rekombinanten Antikörper können in ELISA basierten Screenings, analytischen Assays und in Biosensoren eingesetzt werden. Mit Hilfe von diesen können z. B. die Lebensmittel und die Umwelt z. B. auf Pestiziden, Toxinen, Antibiotika oder Medikamente untersucht werden [27].

3.1.2. Interaktionen mit Aptameren

Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide (RNA oder ssDNA) gewöhnlich mit einer Länge von 20-100 Basen. Der Name Aptamer setzt sich aus dem lateinischen Wort „*aptus*“ und dem griechischen Wort „*meros*“ zusammen und bedeutet „passende Teilchen“, da sie auf Grund ihrer komplexen Sekundär- und Tertiärstrukturen spezifisch mit hoher Affinität an ihr Zielmolekül binden können. Die Dissoziationskonstanten der Aptamere liegen häufig im nano- oder pikomolaren Bereich [28]. Ihre Zielmoleküle können kleine organische Moleküle, Ionen, kleine Peptide oder große Proteine, Viren und Zellen sein [1]. Die Aptamere wurden 1990 von zwei verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander entdeckt, von Ellington & Szostak und von Tuerk & Gold [29, 30]. Das erste selektierte Aptamer richtete sich gegen ein *small molecule*. Ellington und Szostak selektierten ein Aptamer gegen einen kleinen organischen Farbstoff (Cibacron Blue 3GA). Sie verwendeten organische Farbstoffe, weil diese metabolischen Cofaktoren imitieren sollten und sie die Funktion der RNA-Aptamere bestätigen wollten [31]. Seitdem werden Aptamere mit Hilfe der systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) *in vitro* selektiert, im Gegensatz zu Antikörpern, die *in vivo* produziert werden. Während der *in vitro* Selektion können die gewünschten Salzkonzentrationen, die Temperatur, der pH-Wert und das Umgebungsmedium für spätere Anwendungen gewählt werden. Anschließend können die selektierten Nukleotidsequenzen über eine automatisierte chemische Festphasensynthese jederzeit synthetisiert

werden. Aptamere können somit in großen Mengen schnell und reproduzierbar gewonnen werden [32].

Außerdem können Aptamere während ihrer Produktion an einer gewünschten Position in der Nukleotidsequenz modifiziert werden. So kann zum Beispiel ein Fluoreszenzfarbstoff für Detektionsanwendungen, ein spezieller Linker für eine gerichtete Bindungschemie oder weitere Basen zur Verbesserung der Aptamerstabilität bzw. Nukleaseresistenz ohne einen Verlust der Bindungsaffinität oder der Selektivität an das Aptamer gekoppelt werden. Für die gewünschten Anwendungen können sie speziell und flexibel angepasst werden. Außerdem können Aptamere gegen giftige Zielmoleküle, die keine Immunantwort auslösen, wie z. B. Mykotoxine direkt selektiert werden [28]. Die Verwendung von Aptamere als Biorezeptoren wurde in verschiedenen Anwendungen gezeigt. Sie wurden als Biosensoren zur Überwachung der Umwelt und der Lebensmittelsicherheit, als Therapeutika und in der medizinischen Diagnostik eingesetzt, sowie als Bioseparations- und Bioimaging-Moleküle [33].

Sie werden besonders häufig in Biosensoren angewendet, da sie reversible denaturierbar, wiederverwendbar und lange stabil sind. In therapeutischen und diagnostischen Anwendungen wurde bis jetzt nur ein Aptamer 2004 durch die FDA zugelassen. Es ist das Aptamer-basierte Macugen, das an das VEGF bindet und eine abnormale Angiogenese verhindert. Weitere RNA-Aptamere sind in der klinischen Phasen I und IV [34, 35].

Small molecules spielen eine wichtige Rolle in der Medizin, in der Landwirtschaft und in der Umweltanalytik. Das Interesse der Forschung an den Aptameren gegen *small molecules* zeigt die große Anzahl der Veröffentlichungen. Das ATP-Aptamer ist nach dem Thrombin-Aptamer, das Aptamer mit den zweitmeisten Publikationen. Ein großes Hindernis der *small molecule* Aptamertechnologie ist, dass die meisten Aptamer-Veröffentlichungen sich mit Anwendungen der bereits selektierten Aptamere beschäftigen und nur wenige Aptamere gegen *small molecules* neu selektiert werden. In den Jahren zwischen 1990-2011 waren nur 19% der selektierten Aptamere, Aptamere gegen *small molecules* [1].

Die bisher selektierten Aptamere richten sich gegen organische Farbstoffe, Aminosäuren (z. B. L-Arginin, L-Valin), Nukleotide bzw. Cofaktoren (z. B. AMP, FMN, NAD, Guanin), Antibiotika (z. B. Kanamycin A, Streptomycin), Toxine (z. B. Ochratoxin A, Aflatoxin), Pestizide (z. B. Organophosphorus Pestizide), Herbizide (z. B. Atrazin), Hormone (17 β -Estradiol, Abscisinsäure), Kohlenhydrate (Cellobiose), und Naturstoffe

(Theophyllin, Kokain). Die größte Gruppe der Zielmoleküle bilden die Aminosäuren, Nukleotide und Antibiotika [1, 31, 36].

Die Aptamer Datenbank Apta-Index™ führt 124 Aptamere gegen kleine organische Moleküle auf, wobei es mehr RNA- als DNA-Aptamere für *small molecules* gibt (Stand 11.2015). Für Aptamere gegen Proteine verzeichnet die Datenbank mehr als doppelt so viele Einträge (259). Die Selektion von Aptameren gegen *small molecules* ist anspruchsvoller als gegen größere Moleküle wie z. B. Proteine oder Zellen, da sie nicht so viele funktionelle Gruppen aufweisen, mit denen das Aptamer interagieren kann und sie schwerer zu detektieren sind. Daher ist es eine Herausforderung, Aptamere mit einer geringen Dissoziationskonstante gegen *small molecules* zu selektieren. Carothers *et al.*, stellte 2010 die These auf, dass das Molekulargewicht des Zielmoleküls proportional zur Aptameraffinität ist [37]. Doch diese These ist nicht auf alle Aptamere übertragbar, da RNA und DNA Aptamere gegen *small molecules* mit geringen Dissoziationskonstanten in nanomolaren Bereich selektiert wurden (siehe Table 3.1). Es wurde daraus schlussgefolgert, dass die Affinität des Aptamers zu dem Target außerdem von den frei drehbaren Bindungen des Moleküls abhängen kann. [1].

Table 3.1 Selektierte RNA und DNA Aptamere gegen <i>small molecules</i> mit Dissoziationskonstanten (K_D) im nanomolare Bereich.					
Zielmolekül	Stoffgruppe	Aptamer Chemie	K_D [nM]	Jahr	Literatur
Ethanolamin	Alkohol/Amin	DNA	6-19	2005	[38]
Daunomycin	Antibiotikum	DNA	10	2008	[39]
Oxytetracyclin	Antibiotikum	DNA	10	2008	[40]
Bisphenol A	Biosphenol	DNA	8,3	2011	[41]
Atrazin R12.23	Herbizid	DNA	0,62	2014	[42]
Tobramycin	Antibiotikum	RNA	2-3	1995	[43]
L-Arginin	Aminosäure	RNA	330	1996	[44]
Kanamycin	Antibiotikum	RNA	10-30	2004	[45]
Gluthation	Aminosäure	RNA	41,8; 48,9	2011	[46]
Sialyl Lewis X	Kohlenhydrat	RNA	0,0085-10	2011	[47]

Die am meisten verwendeten Aptamere gegen *small molecules* in Biosensoren sind die Aptamere gegen ATP, Kokain, Theophyllin [48] und OTA. Das Aptamer gegen Theophyllin zeigt die gewünschte Selektivität der Aptamere, da bei der Selektion des Aptamers eine Gegenselektion (*counter selection*) angewendet wurde. Das Aptamer bindet mit einer K_D von $0,1 \mu\text{M}$ an das Zielmolekül und mit einer 10.000-fach schlechteren Bindungsaffinität an Koffein, obwohl sie sich nur in einer Methylgruppe an der Position N-7 unterscheiden [49]. Gegen ATP wurden zwei DNA- (1995, 2010) und drei RNA-Aptamere (2000, 2002, 2003) selektiert [1]. Huizenga & Szostak selektierten 1995 das erste und bekannteste ATP-Aptamer DH25.42. Es war das erste Aptamer gegen einen biologischen Cofaktor und richtet sich gegen des Adenosins von ATP und besitzt eine Dissoziationskonstante von $6 \mu\text{M}$ [50]. Die Bindestelle des Aptamers wurde auch mit Hilfe der Microscale Thermophorese bestätigt, in dem verschiedene ähnliche Moleküle getestet wurden (ADP, AMP, SAM, DATP, CTP, Adenine, GTP) [51].

Das Aptamer gegen Kokain wurde 2001 von Stojanovic und Landry publiziert und fünf Jahre später wurde ein Kokain-Schnelltest in Form eines Streifentestes mit diesem Aptamer entwickelt, der kommerziell erhältlich ist [52, 53]. Dies ist eines der wenigen Beispiele, in denen das Potenzial der Aptamere bis in den kommerziellen Bereich ausgeschöpft wird. Aptamere stellen gerade für *small molecules* eine sinnvolle Alternative zu Antikörper dar, da es schwerer ist Antikörper gegen sie herzustellen (siehe Kapitel 3.1.1.2).

Für erfolgreiche kommerzielle Aptamer-Anwendungen müssen weitere Aptamere selektiert werden. Es sollte bei der Selektion beachtet werden, dass die Aptamere unter Bedingungen, die der späteren Anwendung nahe kommen, selektiert werden und nicht in definierten Puffern, nur so sind sie in realen Anwendungen ohne Aktivitätsverlust verwendbar [33].

3.1.2.1. Am Beispiel von einem Ochratoxin A-bindenden Aptamer

Das DNA-Aptamer gegen das organische *small molecule* Ochratoxin A (OTA) wurde 2008 von Cruz-Aguado und Penner selektiert [54]. OTA ist ein Mykotoxin, das von den Schimmelpilzarten der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet wird. In der Fig. 3.2 ist OTA in der Keilstrichformel dargestellt. Es kommt vor allem in Getreide, Wein, Bier, Kaffee- und Kakaobohnen als Kontamination vor [55]. OTA entsteht vor allem bei der falschen Lagerung der Lebensmittel, da eine zu hohe Luftfeuchtigkeit in den Lagerräumen das Wachstum von Schimmelpilzen begünstigt.

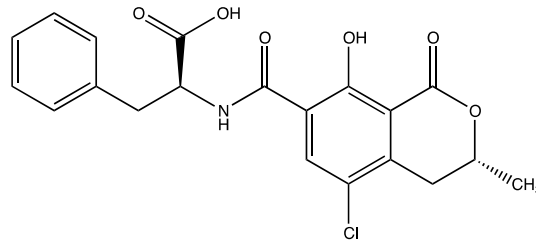


Fig. 3.2 Keilstrichformel des Ochratoxin A.

OTA hat eine immuntoxische, nierenschädigende, fruchtschädigende und kanzerogene Wirkung auf den Menschen. Auf Grund der gesundheitlichen Risiken gibt es seit 2012 in der Europäischen Union eine Regulation (Kommissionregulationsnummer 594/2012) für die zulässige wöchentliche Aufnahme von OTA, sie beträgt 120 ng OTA pro kg des Körpergewichts. Eine weitere EU Regulation (576/2006) schreibt vor, wie viel OTA in Lebensmitteln wie z. B. in Getreide, Kaffee (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oder Wein (2 $\mu\text{g}/\text{l}$) enthalten sein darf [55].

Die Notwendigkeit einer sensitiven und quantitativen Detektion von OTA in den Lebensmitteln war die Motivation von Cruz-Aguado und Penner. Zuvor wurde OTA mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), der Dünnschichtchromatographie oder der Gaschromatographie detektiert [56].

Cruz-Aguado und Penner selektierten ein 36 Nukleotide langes Aptamer gegen OTA mit einer hohen Affinität und Spezifität über eine Säule aus Agarosegranulat, auf der OTA immobilisiert wurde. Bei anschließenden Bindungsuntersuchungen wurde OTA über ein Fluoreszenz-Spektrometer detektiert und quantifiziert. Da OTA bei einer Exzitationswellenlänge von 375 nm fluoresziert, wurde kein an OTA gekoppelter Farbstoff oder eine indirekte Detektion durch einen Fluoreszenz-markiertes Gegenoligonukleotid benötigt. Die anschließende Charakterisierung des Aptamers erfolgte über eine Gleichgewichtsdialyse bei der beide Bindepartner frei in Lösung vorliegen. Die ermittelte K_D für das Aptamer 1.12.2 befand sich im nanomalen Bereich (49 ± 3 nM) und weitere Versuche zeigten, dass das Aptamer sehr spezifisch an OTA bindet. Das Aptamer bindet mit einer 100-fach höheren K_D an Ochratoxin B als an OTA, obwohl sich die beiden Moleküle nur in einer Position unterscheiden. Auch Warfarin und N-Acetylphenylalanin konnten nicht von dem Aptamer gebunden werden. Außerdem entwickelten die Autoren eine Affinitätschromatographiesäule auf der das Aptamer immobilisiert wurde. OTA konnte mit dieser Säule aus Getreideproben determiniert werden [54]. Im gleichen Jahr (2008) veröffentlichten Cruz-Aguado und Penner einen einfach zu handelnden Fluoreszenz-Polarisations-Assay mit einem Detektionslimit von 5 nM OTA. Es handelt sich dabei um

einen Verdrängungsassay bei dem ein Fluoreszenz-markiertes Gegenoligonukleotid, das zur Target-Bindestelle des Aptamers komplementär ist, durch OTA von dem Aptamer gelöst wird [57].

Im Jahr 2010 wurden noch zwei weitere Aptamere (H8 und H12, jeweils 30 Nukleotide lang) gegen OTA mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich von Barthelmebs *et al.* (2010) selektiert und sowohl als direkter und auch als indirekter *Enzym-linked Aptamer Assay* (ELAA) für die Detektion von OTA in Weinproben vorgestellt. Das Detektionslimit des Assays lag bei 1 ng/ml [58].

Die Sequenz der selektierten Aptamere wurden mit der Sequenz des Aptamers 1.12 gegen OTA mit Hilfe eines Sekundärstrukturanalyseprogramm (m-fold) verglichen (siehe Fig. 3.3). Es ließen sich zwei konservierte übereinstimmende Strukturen bei den Aptameren H8, H12, H16 und 1.12 erkennen. Eine Sequenz befindet sich im Stamm (GGGTG TGGG) und die zweite Sequenz im Loop des Aptamers (AGGGAGT). Es wird vermutet, dass das Aptamer eine antiparallele G-Quadruplex ausbildet [59]. Eine bestätigte Sekundärstruktur ist in der Literatur bisher noch nicht veröffentlicht. Die Sequenz im Loop ist möglicherweise für die Bindung von OTA mitverantwortlich. Weitere Aptamere (G3 und G27), die von Barthelmebs *et al.* (2010) selektiert wurden, besitzen nicht dieses Loop-Motiv und haben eine schlechtere Dissoziationskonstante als die anderen drei Aptamere mit dem Loop-Motiv. H16 war kein geeignetes Aptamer für weitere Versuche, da es Kreuzbindungsreaktionen mit OTB und Phenylalanin eingeht [58].

Nach 2008 wurden mehrere Aptamer-basierte Affinitätssäulen zur Abreicherung von OTA aus Lebensmitteln, sowie Aptasensoren mit dem Aptamer 1.12.2 gegen OTA entwickelt [55, 60]. De Giralmo *et al.* verbesserten 2011 die zuvor entwickelte Aptamer-basierte Affinitätssäule von Cruz-Aguado und Penner und koppelten sie an eine HPLC mit Fluoreszenzdetektor, sodass das Detektionslimit in mehreren Getreideproben von 2 ng/g auf 0,023 ng/g gesenkt werden konnten [61].

Wu *et al.* (2011) benutzten als Trägermaterial für die OTA-Aptamere Magnetpartikel. Sie haben den Vorteil, dass sie während der Extraktion von OTA zu der Getreideprobe gegeben werden können und anschließend kein Zentrifugations- oder Filtrationsschritt folgen muss. Die Magnetpartikel können einfach mit einem Magnet zurück gehalten werden [62]. Chapius-Hugon *et al.* (2011) und Rhouati *et al.* (2011) benutzen eine Bromcyan aktivierte Sepharose und entfernten OTA aus Bier und Wein [63, 64].

Auf Grund der Vorteile, die die Aptamere besitzen, entwickelten NeoVentures Biotechnology Inc. mit G. Penner als Präsident und CEO eine kommerziell erhältliche Aptamer-

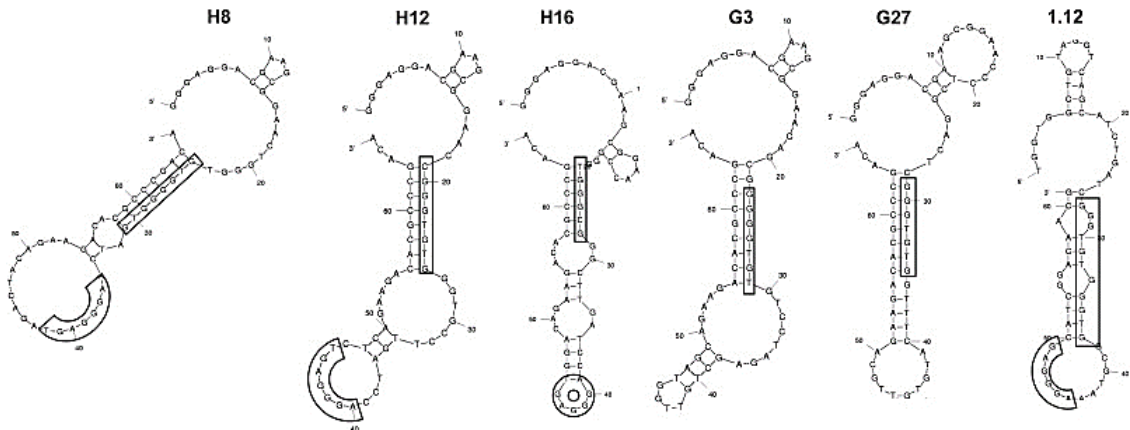


Fig. 3.3 Vorhergesagten Strukturen der selektierten Aptamere H8, H12, H16, G3, G27 und des Aptamers 1.12 gegen OTA. Die konservierten Sequenzabschnitte wurden mit einem Kasten umrandet [58].

basierte Affinitätssäule. Die Firma aus Kanada verkauft neben Aptamer-basierten Detektionsprodukten für Aflatoxin, Aptamer-basierte OTA-Sense Ultrafast Columns und OTA-Sense Detektionssysteme für Getreide, Bier und Wein [65, 66].

Neben den Affinitätssäulen zur Abreicherung für OTA wurden auch Aptasensoren publiziert. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden, in die optischen und die elektrochemischen Sensoren [55]. Elektrochemische Aptasensoren haben den Vorteil gegenüber den optischen Aptasensoren, dass sie sehr sensitiv und kostengünstig sind. Ihr Detektionslimit liegt im Bereich von 0,03-0,8 ng/ml OTA [55]. Die elektrochemischen Aptasensoren sind miniaturisier- und automatisierbar [67]. Die optischen Sensoren können einen kolorimetrischen [55, 59], einen Fluoreszenz- [68] oder einen Luminenz-Transducer [69] besitzen. Bei den meisten Anwendungen wurde das Aptamer 1.12.2 verwendet.

Wang *et al.* (2010) entwickelten z. B. einen Aptamer-basierten Stripassay für eine schnelle Detektion von OTA. Das OTA Aptamer wurde dafür auf Quantum Dots immobilisiert und mit einem 18 Nukleotid langen Poly-Adenosin-Schwanz am 5'-Ende versehen. Auf einer Test- und Kontrollzone des Streifens befinden sich zwei verschiedene DNA-Oligonukleotide, die mit dem Aptamer interagieren können. Ist OTA in dem Medium enthalten, bindet das Aptamer nur die DNA in dem Kontrollabschnitt (18x Thymidine) und nicht in der Testzone (komplementäres Oligonukleotid zum Aptamer), weil das Aptamer OTA gebunden hat. Die Fluoreszenzintensität wurde für die Quantifizierung in beiden Zonen ermittelt. Der Aptasensor hat ein Detektionslimit von 1,9 ng/ml in realen Proben und es werden nur 10 min vom Auftragen der Probe bis zum Erhalten des Ergebnisses benötigt [70].

Das Aptamer gegen Ochratoxin A ist ein gutes Beispiel dafür das Aptamere als biologische Erkennungssysteme eingesetzt werden können. Weitere Herausforderungen sind in der Zukunft aus den *proof-of-concept* Assays und Biosensoren, industriell genutzte Systeme zu entwickeln. Dabei ist eine parallele Detektion von Mykotoxinen erstrebenswert.

3.1.3. Bindungsmechanismen von Proteinen und Aptameren mit *small molecules*

Sowohl Aptamere als auch Proteine binden ihre Zielmoleküle über ihre dreidimensionale Struktur. Diese wird bei Aptameren häufig durch Metallionen stabilisiert. Neben verschiedenen Sekundärstrukturmotiven, wie *stem*, *loops*, *bulges*, *junction* und *hairpins*, können sie auch Tertiärstrukturmotive wie *pseudoknots*, *triplexes* und *quadruplexes* ausbilden [32, 71]. Aptamere, die reich an Guaninen sind, bilden häufig eine G-Quadruplex aus, die aus zwei oder mehr G-Tetraden bestehen. Vier Guaninbasen bilden eine fast quadratische planare Formation (G-Tetrade) mit einem monovalenten Ion im Zentrum aus. Als monovalentes Ion mit einer korrekten Größe eignet sich Na^+ und K^+ . Das Na^+ Ion ist kleiner als das K^+ Ion und kann in der planaren Ebene sitzen. Das K^+ Ion hingegen sitzt eher zwischen zwei G-Tetraden (siehe Fig. 3.4). Die Struktur wird durch Hoogsten Wasserstoffbindungen zwischen den Guaninen und durch die Kationen im Zentrum stabilisiert. *Small molecules*, vor allem planare und aromatische Moleküle, interkalieren zwischen den G-Tetraden und/oder in den Loops der G-Quadruplex [72-74].

Aptamere besitzen eine einzigartige konformative Flexibilität und Anpassungsfähigkeit. Es gibt zwei verschiedene Bindungsmechanismen von Aptameren mit *small molecules*. Die Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und die adaptive Bindung (*induced fit*). Bei dem Schlüssel-Schloss-Prinzip unterscheidet sich die dreidimensionale Struktur des ungebundenen nicht vom gebundenen Zustand des Aptamers. Das Aptamer gegen Thrombin ist ein Beispiel für das Schlüssel-Schloss-Prinzip [75].

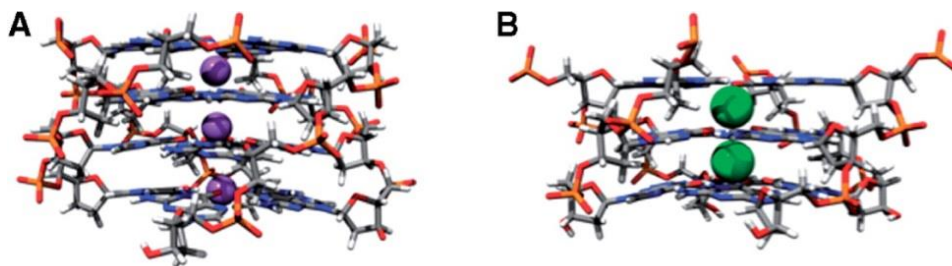


Fig. 3.4 Molekülstruktur einer G-Quadruplex mit Na^+ (A, lila Kugeln) und K^+ (B, grüne Kugeln) Ionen. Die Quartette sind übereinander gestapelt und werden durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninen und durch die Bindung des monovalenten Ions im Center stabilisiert. Die Guanine sind über das Phosphodiesterückrat der Nukleinsäuren verbunden [72].

Hingegen findet beim *induced fit* Mechanismus die Konformationsänderung während der Ausbildung des Aptamer-Target-Komplexes statt [71, 76].

In dem ungebundenen Zustand liegt das Aptamer eher in einer undefinierten Konformation vor oder es sind bereits Struktur motive korrekt gefaltet, deren räumliche Anordnung jedoch noch nicht genau definiert ist. Durch die Strukturänderung des Aptamers in Anwesenheit des Targets werden die möglichen Interaktionen mit dem Zielmolekül maximiert [48]. Das Aptamer gegen L-Argininamid ist neben vielen anderen Aptameren ein Beispiel für den *induced fit* Mechanismus und wird in Fig. 3.5 als molekulares Model gezeigt.

Planare aromatische *small molecules* werden häufig in Bindungstaschen im Inneren der dreidimensionalen Struktur des Aptamers eingeschlossen und werden so zu einen Teil der Nukeloid-Struktur [48]. An der Bindung des Aptamers mit dem Zielmolekül sind verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen beteiligt. Dies können Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen sein. Außerdem wirken gerade bei aromatischen planaren Molekülen steirische und Stapeleffekte [48, 76].

Proteine bilden wie die Aptamere auch Sekundär-, Tertiär- und sogar Quartärstrukturen aus. Bei den Sekundärstrukturen α -Helix, β -Faltblatt und Loop bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amino- und den Carboxylgruppen aus und in einem Protein können mehrere von diesen Strukturelementen gleichzeitig auftreten. Die Tertiärstruktur beruht auf der Interaktion der Aminosäurereste. Sie bilden untereinander Van-der-Waals-Kräfte, ionische, hydrophobe und/oder kovalente Wechselwirkungen aus.

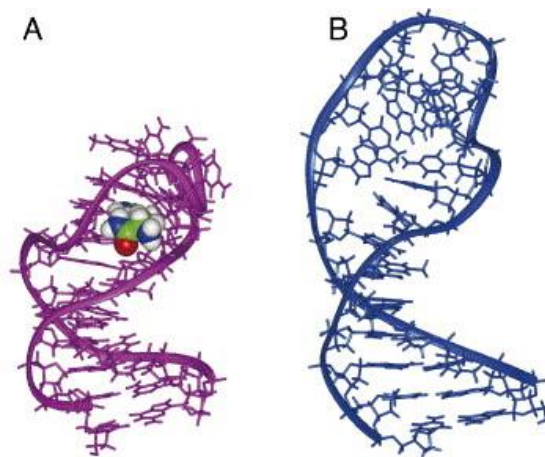


Fig. 3.5 Das Aptamer gegen L-Argininamid in seiner gebunden und ungebunden Form. Das Aptamer ändert seine Konformation mit der Bindung des Zielmoleküls. Der Streumassenradius des Aptamers verringert sich um fast 20%. (A) NMR-Struktur (PBD Code 1OLD) mit dem gebundenen L-Argininamid. (B) Molekulares Model der ungebundenen Struktur des 1OLD, angepasst von [77].

Zwischen zwei Cysteinen kann z. B. eine Disulfidbrücke entstehen. Die Quartärstruktur ist eine Interaktion von zwei oder mehreren Aminosäureketten zu einem multimeren Enzym [2].

Um *small molecules* zu binden, stehen Proteine ähnliche Mechanismen wie den Aptamere zur Verfügung. Sie formen auch eine definierte Bindungstasche für diese aus und beide Biomoleküle bilden nicht-kovalente Wechselwirkungen mit ihren Zielmolekülen. Die Bindungstasche bei den Aptameren ist häufig kompakter als bei den Proteinen. Das liegt daran, dass die Watson-Crick Basenpaarung bei den Nukleinsäuren, im Gegensatz zu den hydrophoben Interaktionen der Aminosäuren, bei den Proteinen vorbestimmt ist. Nichtsdestotrotz können beide Bindepartner hohe Affinitäten und Spezifitäten gegenüber ihren Targets entwickeln [78]. Die Proteine haben den Vorteil, dass sie aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut werden können und dadurch flexibler und effektiver die Targets in ihren zum Teil offenen Bindungstaschen einschließen können. Die Aptamere sind auf Grund ihrer vier Nukleotide bei ihrer Ausbildung von 3D-Strukturen limitierter [76]. Ebenfalls konnte der *induced fit* Mechanismus auch bei Proteinen wie den Keimbahn-Antikörpern nachgewiesen werden. Im ungebundenen Zustand liegen sie in einer anderen Konformation vor als im Antigen-gebunden Zustand [79].

Werden Proteine und Aptamere, die das gleiche *small molecule* binden, anhand von NMR-Analysen verglichen, werden zum Teil die gleichen Wasserstoffbindungen und Stappeffekte beobachtet. So werden gerade aromatische *small molecules* wie Flavin und Adenosin durch Stappeffekte von den RNA-Aptameren und von den Proteinen (Flavoproteine, Glykogenphosphatase b) gebunden. Die Proteine besitzen in der Bindungsdomäne aromatische Aminosäuren wie Tyrosine für diese Effekte [76, 78]. In der Table 3.2 sind die Eigenschaften von Aptameren und Proteinen zur Bindung eines Targets im Vergleich aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass sich die beiden Biomoleküle in ihren Bindungsmechanismen sehr ähneln.

Table 3.2 Eigenschaften von Aptameren und Proteinen zur Bindung eines <i>small molecules</i> im Vergleich. WW: Wechselwirkung.		
	Aptamer	Protein
Bausteine	<ul style="list-style-type: none"> • 4 Nukleobasen (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin bzw. Uracil) + Pentose (Desoxribose, Ribose) = Nukleotide 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 Aminosäuren
Intramolekulare WW	<ul style="list-style-type: none"> • Wasserstoffbrückenbindungen • Hydrophobe WW • Stapel-WW • Van-der-Waals-Kräfte 	<ul style="list-style-type: none"> • Wasserstoffbrückenbindungen • Hydrophobe WW • Stapel-WW • Ionenbindungen • Disulfidbrückenbindung
WW mit dem Traget	<ul style="list-style-type: none"> • Van-der-Waals-Kräfte • Wasserstoffbrückenbindungen • Hydrophobe WW • Sterische Effekte • Stapeleffekte • Ionische WW 	<ul style="list-style-type: none"> • Van-der-Waals-Kräfte • Wasserstoffbrückenbindungen • Hydrophobe WW • Sterische Effekte • Stapeleffekte • Ionische WW
Aufbau Bindetasche	<ul style="list-style-type: none"> • Definierte Bindetasche 	<ul style="list-style-type: none"> • Definierte Bindetasche
Bindungsmodelle	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Induced fit</i> Prinzip • Schlüssel-Schloss-Prinzip 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Induced fit</i> Prinzip • Schlüssel-Schloss-Prinzip
K_D-Werte	<ul style="list-style-type: none"> • Micro- bis nanomolaren Bereich 	<ul style="list-style-type: none"> • Milli- bis nanomolaren Bereich

4. Entwicklung eines Protein-Microarrays zum Screening von potentiellen *small molecule* Inhibitoren

Ziel der ersten Publikation ist die Entwicklung eines Protein-Microarrays zum Screening von potentiellen *small molecules* Inhibitoren für Hitzeschockproteine (HSP).

Es wird aktuell nach Inhibitoren geforscht, die die HSPs deaktivieren, damit Krankheiten, wie Krebs bekämpft werden können. Ein erschwingliches, schnelles und effizientes Screening für HSP-Inhibitoren ist daher von Nöten, um neue hoch affinen Inhibitoren aus den vorhandenen *small molecule* Bibliotheken zu finden. Stand der Forschung ist im Moment ein Screening-Verfahren bei dem Inhibitoren im Mikrotiterplatten überprüft werden und infolgedessen eine große Menge an Proteinen und potentiellen Inhibitoren benötigt wird.

In dieser Veröffentlichung wird ein miniaturisierter Protein-Microarray präsentiert mit dem ein Hochdurchsatz-Screening für potentielle ATP-bindende Protein-Inhibitoren mit einem geringeren Kostenaufwand möglich ist. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Verdrängungsassay, da der potentielle Inhibitor mit einem Fluoreszenz-markiertem ATP (Cy3-ATP) um die ATP-Bindetasche des Proteins konkurriert. Unter Berücksichtigung des Zeitaufwandes wurde die gleichzeitige Zugabe der Moleküle gewählt.

Auf einen einzigen Microarray können mehrere Proteine gespottet und gleichzeitig 16 potentielle *small molecule* Inhibitoren getestet werden. Als Modelproteine für den Assay wurde einerseits das humane HSP90 α , das verschiedenen Onkoproteine wie das mutierte Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert, und andererseits das bakterielle HtpG des *Helicobacter pylori* verwendet. *H. pylori* ist ein gramnegatives mikroaerophiles Bakterium, das im menschlichen Magen überleben kann und wurde verwendet, da es häufig für bakteriellen Infektionen im Magen-Darm-Trakt verantwortlich ist. Eine selektive Inhibierung des HtpG könnte das Proteom des Bakteriums destabilisieren und die Bakterieninfektion könnte eingedämmt werden.

Die Vollängenproteine wurden auf der Nitrocellulosemembran des Microarray mit einem kontaktfreien Spotter aufgetragen, damit diese nicht beschädigt wird. Die Proteine werden durch nicht-kovalente hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Dann wurden das Cy3-markiertes ATP und der potentielle Inhibitor gleichzeitig auf ein Pad des Protein-Microarrays gegeben und nach der Hybridisierung mit einem Fluoreszenz Scanner ausgewertet. Die Fluoreszenz-Intensität der Spots lag im Bereich von 40 000 Counts über dem Hintergrund, sodass ein signifikantes Signal ausgewertet werden konnte.

Mit Hilfe des entwickelten Protein-Microarrays wurde neben bereits bekannten HSP-Inhibitoren auch neue Geldanamycin- und Reblastin-Derivate auf ihren inhibitorischen Effekt hin getestet. Diese Derivate wurden via Mutagenese vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität synthetisiert. Es konnten neue Inhibitoren, die an die ATP-Bindetasche der Hitzeschockproteine mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (0,5 nM - 210 nM) aufweisen, gefunden werden. Ein bedeutendes Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass das Geldanamycin-Derivat 17-AAG nicht das bakterielle HtpG aus *H. pylori* inhibiert, aber das humane HSP90 α , obwohl sich die beiden Proteine in nur wenigen Aminosäuren der ATP-Bindedomäne unterscheiden. Es ist somit möglich, Inhibitoren zu finden die zwischen HSPs aus verschiedenen Spezies diskriminieren können. Außerdem wurde die Lagerstabilität des gedruckten Protein-Microarrays getestet. Dieser zeigte nach einer einmonatigen Lagerung bei 4°C und einen anschließender Verdrängungsversuch mit einem Geldanamycin-Derivat nur einen marginalen Unterschied zu einem frisch gedruckten Microarray.

Der entwickelte Protein-Microarray ist leicht auf weitere HSPs oder ATP-bindende Proteine zu übertragend und ist eine hochflexible Screeningplattform für die Erforschung von *small molecule* Inhibitoren. Es können potentielle Inhibitoren und Proteine parallel getestet und auch Inhibitoren für andere funktionelle Bindungsstellen als die ATP-Bindestelle gefunden werden, da Vollängenproteine verwendet werden.

Weitere Veröffentlichungen zu dem Protein-Microarray sind die Publikationen:

- Hermans, J., Bułyszko, I., Eichner, S., Sasse, F., Collisi, W., Poso, A., Schax, E. (10%), Walter, J.-G., Scheper, T., Kock, K., Herrmann, C., Aliuos, P., Reuter, G., Zeilinger, C. and Kirschning, A. (2015), New, Non-quinone Fluorogeldanamycin Derivatives Strongly Inhibit Hsp90, *ChemBioChem*, 16: 302–311.
- Die in Buchform publizierte Masterarbeit von Emilia Schax (2015), Protein-Microarrays für die Wirkstoffentwicklung, Springer, Reihe „BestMasters“, in dem die Anfänge des entwickelten Protein-Microarray beschrieben sind.
- Andreas Kirschning, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Emilia Schax (20%), Thomas Scheper, Pooyan Aliuos, Carsten Zeilinger (2015), Heat Shock Protein-Based Therapies, Chapter 16: Molecular Survival Strategies of Organisms, Volume 9 of book series “Heat Shock Proteins” published by Springer.

4.1. Microarray-based screening of heat shock protein inhibitors

Emilia Schax^a, Johanna-Gabriela Walter^a, Helene Märzhäuser^a, Frank Stahl^a, Thomas Scheper^a, David A. Agard^b, Simone Eichner^c, Andreas Kirschning^c, Carsten Zeilinger^{d,*}

^aLeibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie and Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Callinstr. 5, D-30167 Hannover, Germany

^bHoward Hughes Medical Institute and the Department of Biochemistry & Biophysics, University of California, San Francisco, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158-2517, USA

^cLeibniz Universität Hannover, Institut für Organische Chemie and Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Schneiderberg 1, D-30167 Hannover, Germany

^dLeibniz Universität Hannover, Institut für Biophysik and Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Herrenhäuserstr. 2, D-30167 Hannover, Germany

*Corresponding author. Tel.: +49 5117624049; fax: +49 5117623456. E-mail address: zeilinger@biophysik.uni-hannover.de

Reprinted from *Journal of Biotechnology* 180 (2014) 1-9, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.006 with kind permission of Elsevier.

4.1.1. Abstract

Based on the importance of heat shock proteins (HSPs) in diseases such as cancer, Alzheimer's disease or malaria, inhibitors of these chaperons are needed. Today's state-of-the-art techniques to identify HSP inhibitors are performed in microplate format, requiring large amounts of proteins and potential inhibitors. In contrast, we have developed a miniaturized protein microarray-based assay to identify novel inhibitors, allowing analysis with 300 pmol of protein. The assay is based on competitive binding of fluorescence-labeled ATP and potential inhibitors to the ATP-binding site of HSP. Therefore, the developed microarray enables the parallel analysis of different ATP-binding proteins on a single microarray. We have demonstrated the possibility of multiplexing by immobilizing full-length human HSP90 α and HtpG of *Helicobacter pylori* on microarrays. Fluorescence-labeled ATP was competed by novel geldanamycin/reblastatin derivatives with IC₅₀ values in the range of 0.5 nM to 4 μ M and Z*-factors between 0.60 and 0.96. Our results demonstrate the potential of a target-oriented multiplexed protein microarray to identify novel inhibitors for different members of the HSP90 family.

Keywords: *Protein microarray, Heat shock protein, Inhibitor, Geldanamycin*

4.1.2. Introduction

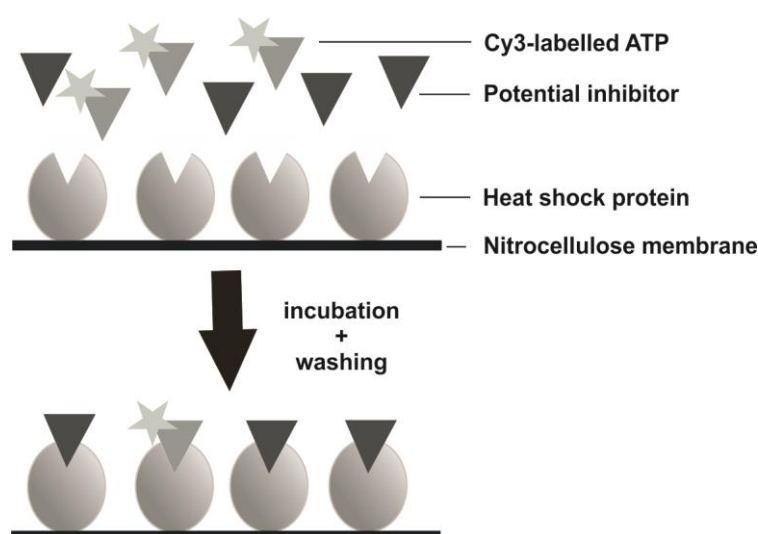
Protein folding by chaperones is one of the crucial ATP-dependent post-translational processes present in both lower and higher eukaryotes, as well as, in bacteria [80]. Stress or extreme environmental conditions, such as UV radiation, oxygen deficiency, the presence

of ethanol or heavy metals, unfold proteins and destroy their function [6, 81]. Heat shock proteins (HSPs) can mediate both the initial folding and the rescue pathway of many damaged or unfolded client proteins without the need for *de novo* synthesis of the affected proteins [82]. In cancer cells, client proteins with incorrect genetic codes are not degraded since chaperones are also “rescuers” of these mutated clients, thereby preventing the induction of apoptotic pathways [83]. In recent years, the chaperone machinery and in particular the HSP90 family has become main targets for developing drugs against cancer and other chaperone-dependent diseases [84-86]. The N-terminus of HSP90 α exhibits an ATP-binding pocket, which is responsible for the ATPase activity of the protein and represents an important target for small molecule inhibitors [87]. Several natural products such as geldanamycin, related ansamycin derivatives such as herbimycin, macbecin, as well as, the phenolic analogues, autolytimycin, reblastatin and radicicol have been found to bind to different positions of HSP90 α [88] (Fig. 4.1).

Derivatives based on geldanamycin, such as 17-N-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (tanespimycin and the corresponding hydrochloride salt (retaspimycin hydrochloride)) were implicated in phase III clinical trials for chemotherapy. Another derivative is the free 17-amino derivative (17-AAG) that has recently reached phase I in clinical trials. All these ansamycin derivatives bind to the N-terminal ATP-binding domain of HSP90 α [89]. These quinone-based geldanamycins and derived analogues induce severe toxic side effects, limiting their applicability as antitumor drugs [12]. As a consequence, there is still a strong demand for improved HSP90 α inhibitors [90-92]. Several assays and screening methods have been recently developed to identify novel HSP90 α inhibitors [93, 94]. Non cell-based assays rely on the following: (a) the detection of free phosphate; (b) the competition for binding of agents to the ATP-binding pocket; (c) the inhibition of HSP90-dependent protein folding; (d) conformational analysis by proteolytic stability; (e) techniques based on surface plasmon resonance (SPR) [95]. Since small molecule libraries contain large numbers of different potential drugs, assays that can be operated in a high throughput manner are needed. To satisfy this need, we have developed a protein microarray based assay to screen for novel inhibitors of HSPs. The microarrays contain full-length target proteins that are immobilized. The arrays are cost effective because only 300 pg proteins per spot and much lower amounts of the inhibitors are required, compared to conventional assays.

Here, we report a new protein microarray assay that is based on the competitive displacement of ATP from the ATP-binding pocket of HSP by potential inhibitors using Cy3-

ATP as the fluorescent probe (Scheme 4.1). The assay design allows the parallel spotting of different ATP-dependent proteins on a single microarray for multiplexed testing of potential inhibitors. In this study we selected purified full-length human HSP90 α and bacterial HtpG from *Helicobacter pylori* as target proteins. We chose HtpG, because it represents an emerging target in infectious diseases. Besides known inhibitors of HSPs we also screened novel compounds derived by mutagenesis in order to demonstrate the applicability of the developed microarray to the identification of new inhibitors of the ATP-binding pocket.



Scheme 4.1 Schematic representation of the direct competition assay using fluorescence-labeled ATP (Cy3-ATP) as reference. HSPs are immobilized on the nitrocellulose membrane of the microarray. The proteins can either bind Cy3-ATP or a potential inhibitor with stronger affinity. After incubation and washing, fluorescence and the binding property of the potential inhibitor are determined.

4.1.3. Materials and methods

4.1.3.1. Purification of the human HSP90 α and bacterial HtpG of *H. pylori*

The *Escherichia coli* strain BL21pLysS/BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was either used to host the plasmid pET 15.1, containing the human HSP90 α gene, or the plasmid pET SUMO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), with the HtpG gene of *H. pylori*. The genes were cloned into the frame of the N-terminal hexahistidine and the TEV and SUMO protease cleavage site, respectively. All protein purification steps were carried out at 4°C and 0.005% (w/v) protease inhibitor (P-8465 from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) added to the lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 2 mM imidazol, 10% (v/v) glycerol) in order to minimize the degradation of recombinant proteins by endogenous proteases. Cell pellets were lysed by two French Press cycles (French[®] Press Amicon 20000, Amicon, USA) at 12,000 psi and adjusted to

100 ml with lysis buffer. Soluble proteins were separated from cellular debris by centrifugation at $25,000 \times g$ for 50 min at 4°C . The recombinant protein was purified from the supernatant by metal chelating Talon resin purchased from Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA) after incubation for 2 h on ice. Unbound proteins were removed by washing buffer containing 500 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, 2 mM imidazol, 20 mM Tris pH 8.0. For stability reasons, the resin was washed with one column volume of buffer containing 1 M KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, 2 mM imidazol, 1 mM Mg-ATP, 0.1% Tween and 20 mM Tris pH 8.0. Subsequently, bound proteins were eluted with two column volumes elution buffer (500 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, 250 mM imidazol and 20 mM Tris pH 8.0). The N-terminal tag of the HSP90 α was removed by TEV protease from Promega (Mannheim, Germany) and the N-terminal tag of the HtpG was cleaved by SUMO protease from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Dialysis was performed against 500-fold volume of buffer containing 20 mM Tris pH 8.0, 20 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol and 10% (v/v) glycerol at 4°C for 24 h. The human HSP90 α protein was further purified by anion exchange chromatography on a MonoQ column in 20 mM Tris-HCl pH 8, and 6 mM β -mercaptoethanol using a linear gradient to 0.5 M KCl. The protein was concentrated with an YM50 centrifugal filter device, Amicon (EMD Millipore Corporation, MA, USA). Homodimeric HSP90 α was isolated by SEC16/60 chromatography in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl and 6 mM β -mercaptoethanol. Finally, the human HSP90 α and the bacterial HtpG was dialyzed into 20 mM Tris pH 8, 20 mM KCl, 6 mM β -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol (storage buffer), and samples were frozen at a concentration of $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in liquid nitrogen and stored at -80°C .

4.1.3.2. Direct competitive displacement assay

HSP90 α ($3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) and HtpG ($1.4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) were spotted in the storage buffer in 4×5 matrices on UniSart[®] 3D nitro slide (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) using a contactless GeSim Nano-Plotter[™] (GeSiM mbH, Großerkmannsdorf, Germany) with a nanotip pipette with a volume of 800-1600 pl (8 drops/dot) onto the nitrocellulose surface of a microarray slide. Nitrocellulose membrane-coated microarrays were chosen because they are known to enable a high binding capacity along with a stabilization of the immobilized protein [96, 97]. The slide was air dried for 30 min at room temperature. Before printed protein arrays were subjected to the direct competitive displacement assay,

nonspecific sites were blocked with 1% (w/v) BSA in storage buffer for 1 h at room temperature. 16 well hybridizations chambers of Nexterion (Schott Nexterion, Mainz, Germany) were used to separate the subarrays.

For screening of inhibitors, the subarrays were incubated with a mixture of 100 nM Cy3-ATP (NU-833-CY3) purchased from Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) and GA derivatives (see Section 1.1.3.3) or radicicol in binding buffer (20 mM HEPES–KOH, pH 7.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Na₂MoO₄, 0.01% (v/v) Tween20, 2% (v/v) DMSO, 1 mM DTT, 0.1 mg·ml⁻¹ BSA) for 16 h at 4°C. Per subarray 50 µl of the mixture were applied and to determine IC₅₀ values of the potential inhibitors, the concentration of GA derivatives was varied from 50 µM to 50 pM. As a positive control a mix of binding buffer, 100 nM Cy3-ATP and geldanamycin derivative 12 (50 µM) were and the negative control was binding buffer with 100 nM Cy3-ATP with lack of the potential inhibitor. The slides were washed after the incubation three times for 5 min with binding buffer and afterwards dried with compressed air. Fluorescence originating from Cy3-labeled ATP was determined by GenePix 4000B Laser Scanner (Molecular Devices, Inc.) with 532 nm emission wavelength, laser power 33%, PMT gain 350 and calculated using the program GenePix6.1 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) and ImaGene 5 of BioDiscovery, Inc. (Hawthorne, CA, USA). The evaluation of the displacement was done with the IC₅₀ value. The dose-response curves were calculated with Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and fitted with the non-linear function logistic, A1 = 0, A2 = 1.

4.1.3.3. Preparation of potential inhibitors

All geldanamycin derivatives, except for 17-AAG, used in this study were obtained as previously reported [20, 98]. The synthetic strategy relied on mutasynthesis [99, 100] using a mutant strain of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* that was blocked in the biosynthesis of the starter unit 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) [101]. 17-AAG and radicicol are commercially available (Biomol, Hamburg, Germany; Sigma-Aldrich, Munich, Germany).

4.1.3.4. Synthesis of thiophene-substituted reblastatin derivatives

Bromo-reblastatin 13 (0.8 mg, 1.4 µmol, 1 eq.) was dissolved in a degassed mixture of DME and water (3:1, 1 ml) and K₂CO₃ (0.3 mg, 2 µmol, 1.5 eq.), Thiophene-3-boronic acid 27 (0.2 mg, 1.5 µmol, 1.1 eq.) and Pd(Ph₃)₄ (0.1 mg, 0.1 µmol, 5 mol %) were added.

The reaction mixture was heated at 90°C for 24 h. After cooling to room temperature, water (5 ml) and ethyl acetate (5 ml) were added. The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (three times) and the combined organic extracts were dried (Na₂SO₄). The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by HPLC as described in the supporting information.

For reblastin derivatives 29 and 31 the procedure was identical to that described for reblastatin derivatives 28 and 30 except for the amount of bromo-reblastatin 14 (1.2 mg, 2.0 μmol) chosen.

4.1.3.5. Analysis of potential inhibitors

¹H-NMR spectra were measured at 400 MHz with a BRUKER Avance-400 or at 500 MHz with a BRUKER DRX-500 at room temperature. ¹³C-NMR spectra were measured at 100 MHz with a BRUKER Avance-400 and at 125 MHz with a BRUKER DRX-500. Mass spectra were obtained with a type Q-TOF premier (MICRO-MASS) spectrometer (ESI mode) in combination with a WATERS Acquity S2 UPLC system equipped with a WATERS Acquity UPLCBEH C18 1.7 μm (SN 01473711315545) column (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Analytical thin-layer chromatography was performed using precoated silica gel 60 F254 plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and the spots were visualized with UV light at 254 nm or alternatively by staining with ninhydrin, permanganate or 4-methoxybenzaldehyde solutions. More information on the analytical techniques and the results of the analysis can be found in the supporting information.

4.1.4. Results and discussion

4.1.4.1. Development of a direct competitive protein microarray

We purified recombinant full length human HSP90α as well as HtpG of *H. pylori* from *E. coli* lysates. These purified dimeric proteins were spotted on nitrocellulose membrane coated microarray substrates. The two proteins were spotted side by side on the membrane with 10 replicates for each protein. The microarrays were blocked with 1% (w/v) BSA for capping vacant binding sites on the nitrocellulose surface and to reduce nonspecific binding.

Based on the resulting microarray, we have investigated two principal options to develop a competitive assay for screening inhibitory effects associated with the ATP-binding pocket of HSP. One option utilizes fluorescence-labeled geldanamycin 10 (Fig. 4.1)

which is a well-known inhibitor binding to the ATP-binding pocket. Indeed, in preliminary experiments we found that potential inhibitors are able to displace FITC-labeled geldanamycin bound to the N-terminal ATP-binding pocket of human HSP90 α [20]. Fig. 4.2 shows exemplary one dose-response curve of the competitive displacement assay for human HSP90 α with FITC-labeled geldanamycin and tanespimycin as displacement molecule. A second strategy for monitoring the inhibition of ATP-dependent proteins can rely on fluorescence-labeled ATP (Cy3-ATP) 11 representing the natural ligand with high affinity. Cy3-ATP is more stable and sensitive in comparison to FITC-GA. With either of these fluorescence-labeled ligands potential inhibitors of HSP90 can be screened in a competitive assay. To establish a robust and efficient displacement assay that is applicable for a broad range of different ATP-dependent proteins we have decided to use Cy3-ATP for all further experiments. Therefore, we first investigated Cy3-ATP binding to HSP90 α and HtpG immobilized on the microarrays, as well as, competitive binding between Cy3-ATP and unlabeled ATP to the proteins. In this test setup, the protein is given the choice to either bind Cy3-ATP 11 or unlabeled ATP. For Cy3-ATP a constant concentration of 100 nM was chosen while the concentration of unlabeled ATP was varied from 5 nM to 10 mM. The resulting mixtures were incubated separately on the subarrays containing both proteins. The competition for the ATP-binding site was monitored by measuring the decrease of fluorescence as a function of the concentration of unlabeled ATP. After incubation and washing, the microarray was scanned (Fig. 4.3). The dilution series with unlabeled ATP is shown from left to right and from top to bottom. The decrease of HSP-bound Cy3-ATP is clearly visible for both proteins. The results also show that Cy3-labeled ATP binds to both proteins under the assay conditions.

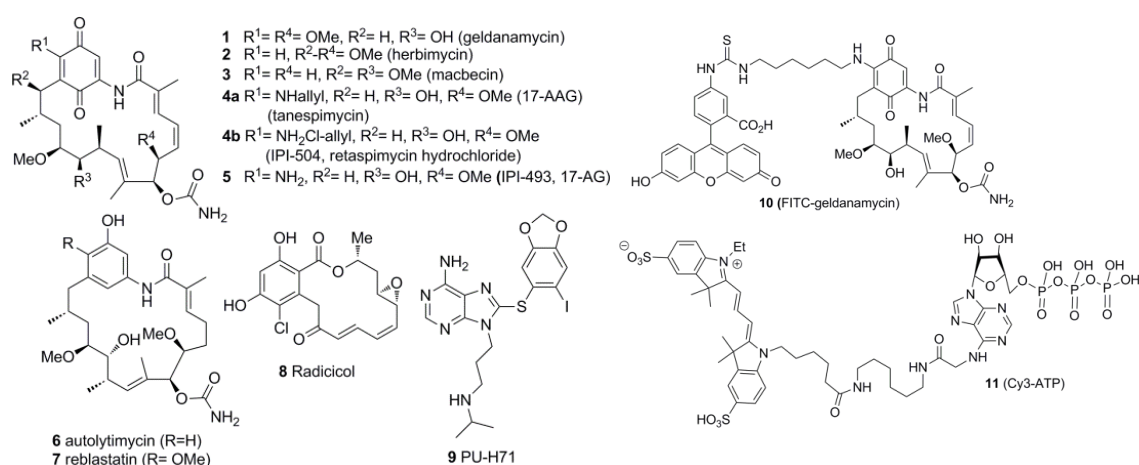


Fig. 4.1 Selected structures of natural products 1-3 and 6-8 with Hsp90 inhibitory properties and clinical candidates 4, 5 and 9. Structures of 10 fluorescence-labeled geldanamycin (FITC-GA) and 11 ATP (Cy3-ATP).

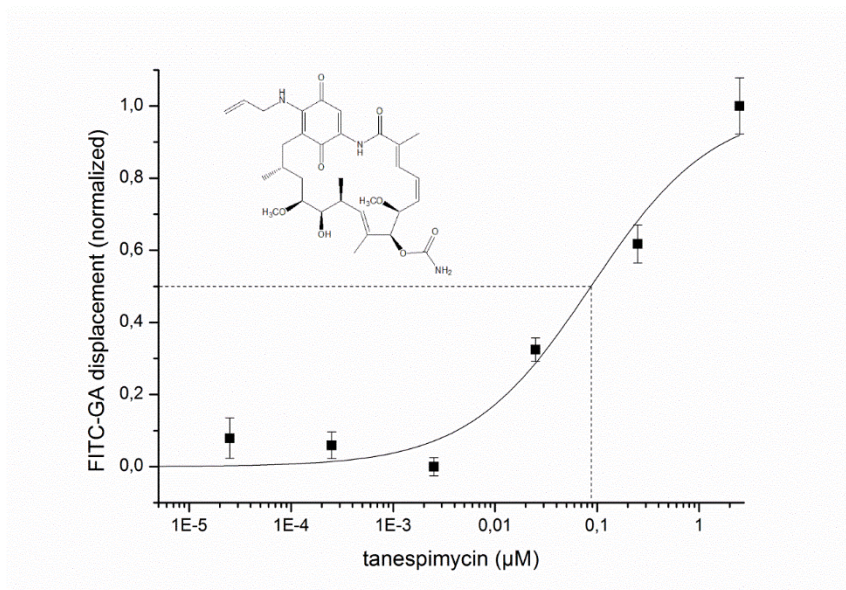


Fig. 4.2 Dose-response curve of the competitive displacement assay for human HSP90 with FITC-GA and molecule 12, respectively, serving as displacement ligand (non-linear fit: logistic, fitting parameters: $A1 = 0$, $A2 = 1$). Note, the inhibitor concentration is given logarithmically as a function of the normalized fluorescence signal from FITC-GA. The calculated IC_{50} for this molecule is 87.31 ± 4.4 nM.

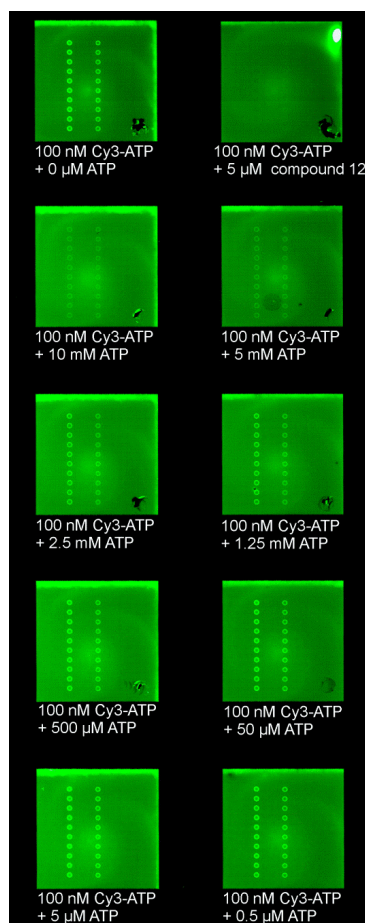


Fig. 4.3 Presentation of a protein microarray after the direct displacement assay with Cy3-ATP labeled proteins. The human HSP90 α (row on the left side) and the prokaryotic HtpG (row on the right side) were spotted side by side on the membrane with 10 repeats on each subarray. The dilution series of unlabeled ATP as displacement ligand are arranged from left to right and from top to bottom.

The dose-response curves of the competitive displacement assay for both HSPs in the presence of ATP are shown in Fig. 4.4.

The fitted curves were used to calculate the IC_{50} values for both proteins. The computed IC_{50} value for HSP90 α is 0.71 ± 0.16 μ M and for HtpG it is 0.51 ± 0.16 μ M. The K_d for the ATP of the HSP90 α has been reported to be 0.4 μ M [98]. The measured IC_{50} value for the human HSP90 α is in the same range as the reported K_d , but somewhat higher than expected from the literature. This can be explained by the fact that Cy3-ATP binding, by comparison with ATP may be sterically hindered. Both measured IC_{50} values are in a range suitable for further developing the direct competitive assay with Cy3-ATP as ATP analogue.

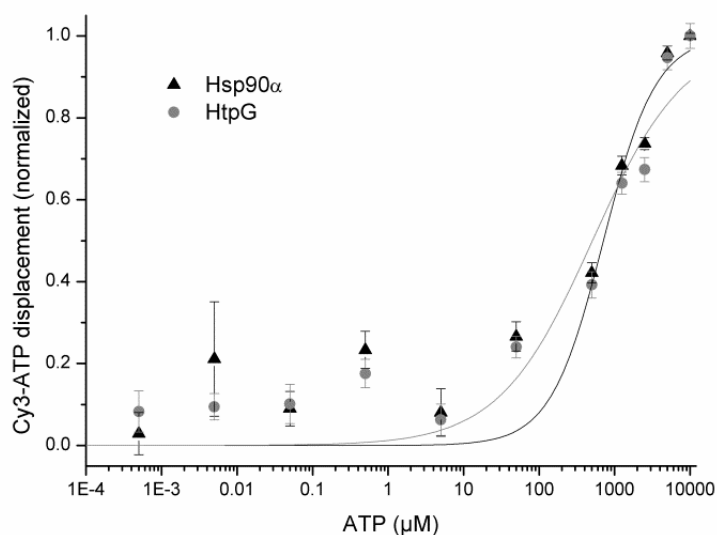


Fig. 4.4 Dose-response curve of the competitive displacement assay with Cy3-ATP and ATP, respectively, serving as displacement ligand (non-linear fit: logistic, fitting parameters: $A1 = 0$, $A2 = 1$). Note the concentration of unlabeled ATP is presented logarithmically as a function of the normalized fluorescence signal from Cy3-ATP.

4.1.4.2. Direct competitive assay with potential inhibitors and quality validation of the microarray

In the second phase of assay development, we studied the displacement of HSP90-bound ATP by known HSP90 α inhibitors such as geldanamycin, 17-AAG and radicicol. In addition, we included a series of non-benzoquinone geldanamycin derivatives 12-21 and lactones 22-25 that we recently prepared by mutasynthesis using a mutant strain of *S. hygroscopicus*, the bacterial producer of geldanamycin (Fig. 4.5) [102]. This mutant strain was genetically blocked in the biosynthetic gene cluster of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) the starter building block for the polyketide synthase (PKS). In addition,

we prepared two new 18-thiophene-substituted geldanamycin derivatives. The Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction of 18-bromo geldanamycin derivatives 13 and 14, with thiophenyl-3-boronic acid 27, provided thiophene-substituted geldanamycin derivatives 28 and 29 (Scheme 4.2). It is worth mentioning that this is the first example of a geldanamycin derivative that is semi synthetically derivatized by a Pd-catalyzed cross-coupling protocol. This should only be possible for non-benzoquinone geldanamycin derivatives. Interestingly, the basic conditions required for the cross-coupling reaction led to the formation of decarbamoylated derivatives 30 and 31. However, we did not include these by-products into our assay studies, because it is well established that the carbamoyl group is a key pharmacophore in geldanamycin-based inhibitors. Practically, the assay was performed by preparing the microarray as described before and the subarrays were incubated with solutions consisting of 100 nM Cy3-ATP, the binding buffer and the potential inhibitor at different concentrations (50 μ M, 5 μ M, 0.5 μ M, 50 nM, 5 nM, 0.5 nM, 50 pM) for 16 h at 4°C. Unbound Cy3-ATP was removed by washing and then the fluorescence signal originating from the bound Cy3-ATP was determined. Since most inhibitors require hydrophobic mediators, different DMSO concentrations and DMSO/methanol combinations were tested. A concentration of 2% (v/v) DMSO was tolerable for the recovery of Cy3-ATP binding.

The signal intensity for each spot was in the range of 40,000 counts above the background (18,000 counts). Several geldanamycin derivatives 12, 13, 15, as well as radicicol show inhibitory properties toward HtpG and their dose-response curves are summarized in one graph (Fig. 4.6). Clearly, this group of compounds exerts a higher affinity for the ATP-binding pocket than ATP itself. The curves and IC_{50} values of the geldanamycin derivatives 12 ($IC_{50} = 5 \pm 0.6$ nM) and 13 ($IC_{50} = 5 \pm 2$ nM), both show excellent inhibitory activity toward HtpG. A lower IC_{50} value correlates with better inhibitory activity, since even a small concentration of the inhibitor is sufficient to displace half of the bound Cy3-ATP from the ATP-binding pocket. Remarkably, 17-AAG does not show strong binding affinity to HtpG of *H. pylori*. This observation is likely based on the fact that HtpG of *H. pylori* resembles the bacterial HtpG of *S. hygroscopicus*, the geldanamycin producer which is expected not to be blocked by its own metabolite [27].

However, geldanamycin derivatives 12-15 and radicicol show strong binding to both proteins, with IC_{50} values in the range of 121 nM. The new thiophenyl-substituted geldanamycin derivatives 28 and 29 are basically inactive toward the two HSPs.

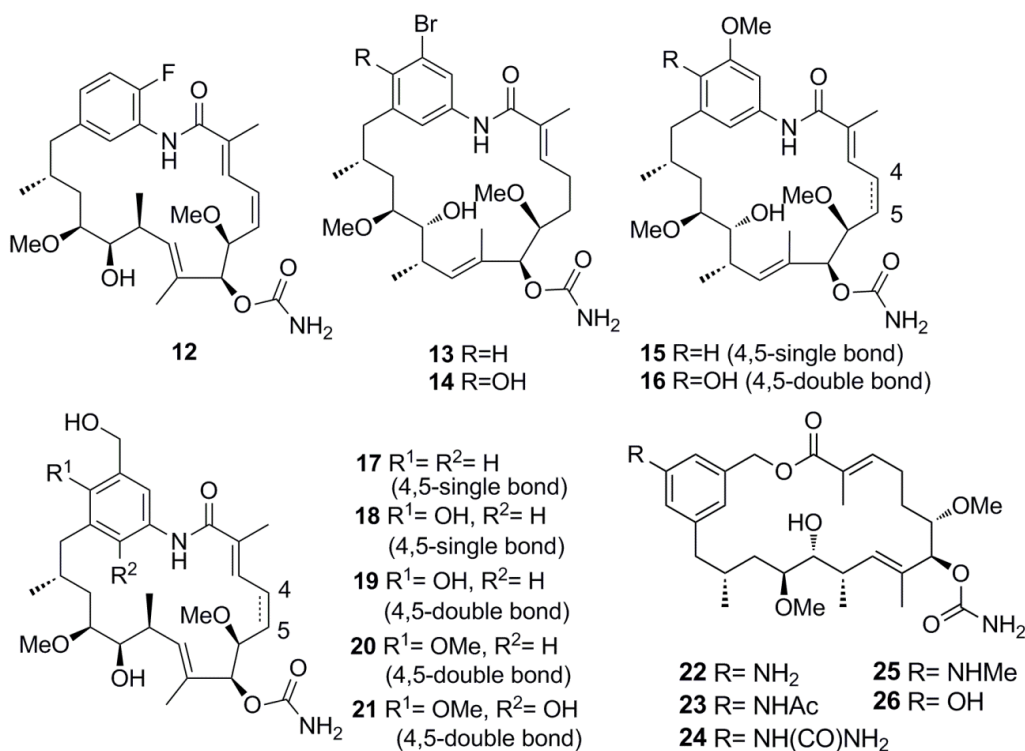
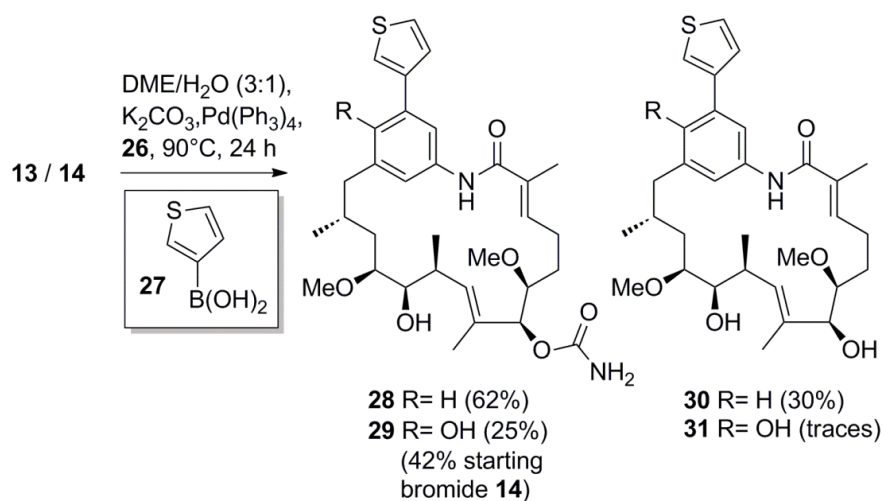


Fig. 4.5 Structures of non-quinone geldanamycin derivatives 12–21 and macrolactones 22–26 obtained by mutasynthesis and tested here.



Scheme 4.2 Suzuki-Miyaura cross-coupling of bromo-geldanamycin derivatives 13 and 14, respectively, with boronic acid 27.

The nature of the substituent on the phenol ring of geldanamycin had a large impact on the binding affinity for the N-terminal ATP-binding domain. The introduction of fluorine (12) or bromine (13 and 14) showed a stronger competition by a factor of around ten compared to the effect of a hydroxyl group in both HSP90 α and HtpG. Compound 15, bearing a methoxy group, was found to be a better inhibitor of human HSP90 α than HtpG. The macrolactones 22-26, are not bound by the HSPs. The IC₅₀ values determined by

these HSP microarray experiments are in some cases a factor of 10-100 lower than those found for mammalian cancer cell lines [21, 26, 28]. Both assays reveal that derivatives 12-15 have lower IC_{50} values than compounds 17-21. Clearly, when inhibitors are tested against whole cells, the effects of membrane penetration, active secretion via transporters, and exposure to the whole enzymatic machinery of the cell, needs to be considered and could explain the large differences observed *in vivo*.

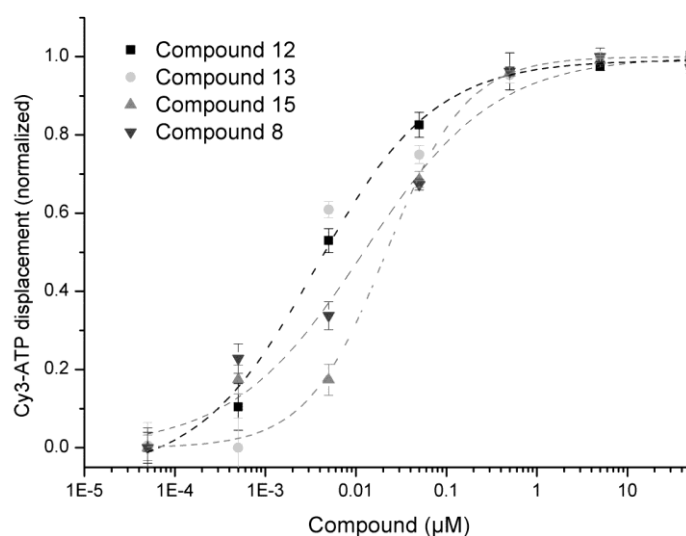


Fig. 4.6 Dose–response curves of the direct competitive displacement assay for the HtpG of *H. pylori* using 12, 13, 15, radicicol 8 as ligands. Used non-linear fit was logistic, $A1 = 0$, $A2 = 1$. Note, the inhibitor concentration is given logarithmically as a function of the normalized fluorescence signal from Cy3-ATP.

4.1.4.3. Quality validation of the microarray

To validate the quality of the microarrays, we calculated the Z^* -factor in analogy to the Z -factor reported by Zhang *et al.* (1999), see supporting information. In our case the binding buffer with 100 nM Cy3-ATP served as negative control and geldanamycin derivative 12 was chosen as positive control. In preliminary experiments this molecule showed better inhibitory properties than geldanamycin. Indeed, Z^* -factors found for all inhibitors fit into the required range $0.5 < Z^* < 1.0$ for a powerful and reliable assay. Table 4.1 summarizes all IC_{50} values and Z^* -factors of potential inhibitors for both proteins. For comparison competition data were obtained before by cell based assay, fluorescence polarization [20] and with FITC-labeled GA. It can be seen that small differences occur between the tests systems; where as ineffective inhibitors had no effect in all test systems

Table 4.1 Summary of the calculated IC₅₀ values of Hsp90α from *H. sapiens* and of HtpG from *H. pylori* and the specific Z*-factors of each protein microarray.

Compound ^[a]	IC ₅₀ Hsp90α [nM]	Z*-factor	IC ₅₀ HtpG [nM]	Z*-factor
4a	51 ± 17	0.83 ^[b]	n. b. ^[c]	0.75 [□]
8	3 ± 2	0.72 [□]	12 ± 3	0.94 [□]
12	0.5 ± 0.2	0.68 [□]	5 ± 0.6	0.86 [□]
13	4 ± 1	0.69 [□]	5 ± 2	0.94 [□]
14	5 ± 0.3	0.90 [□]	3 ± 1	0.92 [□]
15	2 ± 0.7	0.60 [□]	21 ± 6	0.90 [□]
16	3 ± 5.4	0.67	0.3 ± 0.4	0.90
17	7.5 ± 1.3	0.67	2.6 ± 4.1	0.76
18	31 ± 15	0.96 [□]	78 ± 51	0.85 [□]
19	49 ± 41	0.95 [□]	107 ± 190	0.96 [□]
20	107 ± 21	0.69 [□]	219 ± 76	0.94 [□]
21	4.8 ± 9	0.70	1 ± 2.8	0.62
22	n. b.	0.63	n. b.	0.61
23	n. b.	0.61	n. b.	0.56
24	n. b.	0.95 [□]	n. b.	0.93 [□]
25	n. b.	0.61	n. b.	0.57
26	n. b.	0.91 [□]	n. b.	0.78 [□]
28	n. b.	0.92	n. b.	0.96
29	n. b.	0.92 [□]	n. b.	0.95 [□]

^[a] The structures of test compounds are depicted in Fig. 4.5 and Scheme 4.2
^[b] as positive control for the Z*-factor calculation exclusively binding buffer was used
^[c] n.b. = no binding.

4.1.4.4. Storage stability of the protein microarray

Importantly, we tested the stability for the protein spotted microarrays to prolonged storage. This would be advantageous in terms of convenience and ease of use. We checked the stability of spotted microarrays stored at 4°C for up to one month after spotting. The dose-response curves conducted with compound 12 are shown in Fig. 4.7. The differences

of the IC_{50} are marginal and we could not see relationship to the storage time and the IC_{50} values.

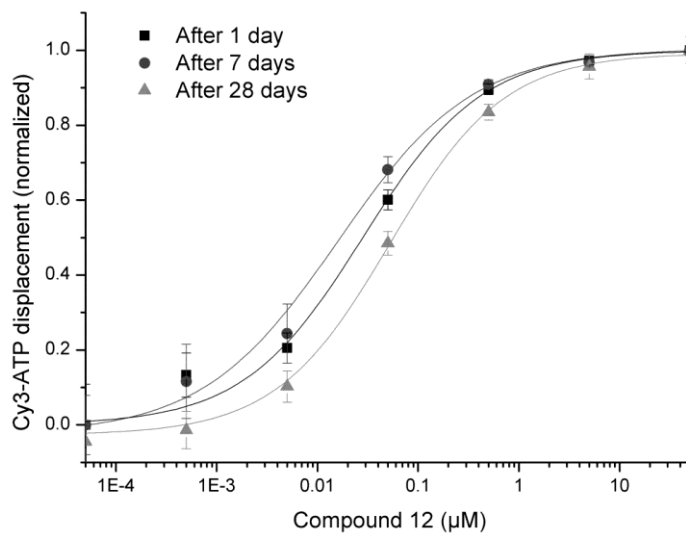


Fig. 4.7 Dose-response curves of the direct competitive displacement assay for the human HSP90 α using 12 as ligand for testing the storage stability of the protein spotted microarray. The different curves show the direct competitive displacement assay for three time points within one month.

4.1.5. Conclusion

In conclusion, we have developed a new microarray system for testing binding activities of ATP-dependent proteins. The protein microarray technology provides a robust and efficient way to investigate the functions of the protein in a fast, efficient and affordable manner. Furthermore, this technique is amenable to automation. The degree of miniaturization, as well as, the potential for multiplexing is very high. To demonstrate its utility, we used the assay to screen for inhibitors of human HSP90 α , as well as for inhibitors of its bacterial homologue HtpG (from *H. pylori*) and detected the binding of small molecules to the ATP-binding pockets. The assay relies on the displacement of fluorescence-labeled ATP bound to HSPs. The concept of the assay is general, so that it should be transferable to other ATP-dependent HSPs and enzymes like myosin. Furthermore, the utilization of full-length proteins has the advantage that other fluorescence-labeled inhibitors binding to other portions of the protein than the ATP-binding site such as peptides and proteins can be included into screening programs. Consequently, the developed protein microarray represents a highly flexible screening platform allowing the multiplexed investigation on different levels of the assay: (i) as for other screening systems, different

potential inhibitors can be investigated in parallel; (ii) moreover, different target proteins related to various diseases can be investigated simultaneously in order to obtain substances that inhibit these targets and/or to identify undesired inhibition which may be a cause of adverse reaction; (iii) finally, due to the application of full-length proteins, the microarray offers the potential to screen for inhibitors of different functional sites within one target protein.

The IC_{50} values obtained are in good relation with [20, 91, 93, 98, 102]. An important outcome of this preliminary study is the observation that drug candidates derived from benzoquinone geldanamycin like 17-AAG do not inhibit the bacterial HtpG that only differs from the human HSP90 α in a few key amino acids. However, some of the non-benzoquinone geldanamycin derivatives particularly the 19-fluoro derivative 12 is able to inhibit both HSP90 α as well as HtpG in the lower nanomolar range. This assay will allow us to search for small molecules that selectively inhibit pathogenic bacteria HSPs and not the human HSP90 α . Among the compounds tested here, one candidate was found, namely 17-AAG, which showed the reversed selectivity.

Acknowledgment

We thank H. Floss (Univ. Washington, USA) for scientific and technical support.

5. Anwendungen mit dem entwickelten Protein-Microarray für das Screening von potentiellen *small molecule* Inhibitoren

Im Rahmen dieser Publikation werden weitere Anwendungen und das Potential des entwickelten kompetitiven Protein-Microarray vorgestellt.

Es wird zum einen die Multiplexing-Kapazität des Assay demonstriert, indem zu den humanen HSP90 α und dem bakteriellen HtpG noch ein drittes pflanzliches HSP hinzukommt, das HSP83 aus *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* ist eine Pflanze, die in der Landwirtschaft als Unkraut gewertet wird. Durch einen geeigneten Inhibitor für pflanzliche HSPs könnten unerwünschte Pflanzen in der Landwirtschaft eingedämmt werden. Es wurde die Bindung des Geldanamycin-Derivat 17-AAG und eines Bromo-Reblastin-Derivats für HSP83 getestet, da sie an anderen HSPs mit einer hohen Affinität binden. Beide inhibierten das HSP mit IC₅₀-Werten von 291 nM bzw. 79 nM.

Mit Hilfe des entwickelten Microarrays ist es möglich, *small molecule* Wirkstoffvorläufer zu finden, die spezifisch an bakterielle und nicht an die humanen HSPs binden. Letzteres zeigt, dass eine erfolgreiche Krankheitsbekämpfung möglich wäre ohne die Zellen des Menschen zu gefährden.

Zum anderen wurde ein Assay mit humanen Krebszelllysaten entwickelt, der somit weitere zukünftige diagnostische Anwendungen in der Krebstherapie und in der personalisierten Medizin eröffnet. Es wurden Krebszelllysate auf den Microarray immobilisiert und anschließend wurde der Verdrängungsassay mit einem 18-Dehydrox-19-fluoro-Reblastin durchgeführt. Dieser Inhibitor ist am Phenylring fluoriniert und wurde gewählt, da er in vorherigen Versuchen eine starke Affinität zu der ATP-Bindetasche der HSPs zeigte. In diesen Zelllysate-Versuch konnte eine erfolgreiche Verdrängung des Cy3-ATPs aus der Bindedomäne durch das *small molecule* detektiert werden. HSP90 α könnte somit als Zellstressmarker für entnommene Gewebeproben und Körperflüssigkeiten dienen.

Im dritten Teil dieser Veröffentlichung wird die Möglichkeit aufgezeigt, neben der ATP-Bindedomäne auch andere aktive Bindungsdomänen der HSPs für die Wirkstoffsuche auf dem Protein-Microarray zu finden. Eine dieser Bindungsstellen, ist die Klienten-Bindungsdomäne. Es wurden drei verschiedene Volllängenproteine (Luciferase, Calmodulin, KcsA) in ihrer nativen und denaturierten Form, auf die Bindung an die HSP90 α Klienten-Bindungsdomäne getestet. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Hitze. Die Proteine wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert, bevor sie zu dem HSP90 α auf

die Microarrays gegeben wurden. Das HSP sollte bevorzugt die denaturierten Proteine binden, da die Chaperone diese Proteine bei ihrer Faltung und Reifung in deren dreidimensionale Struktur unterstützt. Bei dem Kaliumkanal KcsA wurde kein Unterschied von der Bindung der nativen oder denaturierten Form festgestellt; Beide Formen des Proteins wurden von HSP90 α gebunden. Im Fall des Enzyms Luciferase wurde nur die denaturierte Form gebunden, so wie es zuvor erwartet wurde. Das Calmodulin zeigte weder im nativen noch im denaturierten Zustand ein Bindungssignal. Calmodulin ist im Vergleich zu den anderen untersuchten Proteinen hitzestabil, sodass eventuell keine denaturierte Form des Proteins entstanden ist. Diese Versuche zeigten, dass die Klientenbindungsdomäne des gespalteten HSP auf dem Microarray aktiv ist und dass diese Domäne als zusätzlicher Zielort für Wirkstoff-Screenings von Bedeutung sein kann.

Zusammenfassend ist der entwickelte kompetitive Protein-Microarray vielseitig einsetzbar und sein Potential für weitere Anwendungen ist bisher nicht ausgeschöpft. Eine Übertragung des HSP-Microarray auf andere ATP-bindende Proteine oder eine Optimierung des Zellysate-Microarrays wären nächste mögliche Schritte.

5.1. Multiplexed heat shock protein microarray as a screening platform for the selection of novel drug compounds

Emilia Schax¹, Janek Neunaber³, Frank Stahl¹, Johanna-Gabriela Walter¹, Thomas Schep¹, Simone Eichner², Andreas Kirschning², Carsten Zeilinger^{3*}

¹Gottfried-Wilhelm Leibniz University Hannover, Institut für Technische Chemie und Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Callinstr. 3, D-30167 Hannover, Germany

²Gottfried-Wilhelm Leibniz University Hannover, Institut für Organische Chemie and Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Schneiderberg 1B, D-30167 Hannover, Germany

³Leibniz Universität Hannover, Institut für Biophysik and Biomolekulares Wirkstoffzentrum (BMWZ), Herrenhäuserstr. 2, D-30167 Hannover, Germany

*Corresponding Author: C. Zeilinger, email: zeilinger@biophysik.uni-hannover.de

Reprinted from the open-access Journal *BioDiscovery*, 2014; 14: 1; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2014.14.1.

5.1.1. Abstract

In diseases such as cancer, Alzheimer's disease or malaria, disease-related proteins take advantage of the heat shock protein (HSP) control system for their own activation or maturation. There is a quest to find inhibitors that specifically bind to the HSPs. Here, we report on a novel multiplexed assay system for inhibitor screening based on a protein microarray (MA) technique that was developed for routine applications with storable MAs. Purified HSPs are printed as full-length proteins on microarrays and used as a drug target for the screening of new inhibitors. Derivatives obtained by a combination of biological and chemical synthesis were tested as competitors of ATP with a suggested affinity for several HSP proteins which are hHSP from human, AtHSP83 (*Arabidopsis thaliana*) and HtpG from *Helicobacter pylori*. Some of these new derivatives exerted selectivity between human and bacterial heat shock proteins. Printed human HSP90 was used to test the binding of denatured proteins on the client binding site of human HSP90, since the full-length HSP maintains the capability to bind putative clients or cochaperones. Initial data revealed that the microarray application can be used to identify directly elevated heat-shock protein levels in cancer cell lysates. We suggest that microarray-based assaying of HSP levels can be used as a marker for determining stress levels.

Keywords: *heat shock protein, inhibitor, non-benzoquinone geldanamycin, protein microarray, screening*

5.1.2. Background

Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperones, which help other proteins to mature and fold to their native structure even under extreme environmental conditions. HSPs are essential for the maintenance and function of the proteome [10, 81, 103, 104]. Due to their special key position mediating a rescue mechanism, HSPs are targets for drug development in diseases such as cancer [82, 105-107]. Inhibitors or drugs lower increased cellular HSP90 activity and thereby increase misfolded client proteins with oncogenic potential that arise as a result from mutations [12, 108-110]. This ideally leads to the death of the cell or in special cases to the reduction of a pathogen, when a suitable HSP inhibitor is present. Within this study we used a recently reported HSP microarray for the target-oriented screening of HSP inhibitors [111]. While in our previous publication [111] the microarray was solely used to screen molecules for their potential to inhibit the ATP binding sites of HSP90 and HtpG, this short communication aims to further broaden the range of applications:

- (i) Since the ATP-binding sites exist in all HSP target proteins, different target proteins can be examined in parallel in a multiplexing approach. The assay is performed with tiny amounts per spot (800-1600 picoliters) without limiting the sensitivity. The recombinant purified target proteins bind labeled ATP; binding and displacement by potential inhibitors can be detected optically in the microarray format. In this communication, we demonstrate the multiplexing capability by using human HSP90, bacterial HtpG, and plant-derived HSP83.
- (ii) The assay can also be performed with HSP originating from cell lysates by directly printing the lysates to the microarray. We show that this lysate microarray can be used to detect elevated HSP titers and hypothesis potential diagnostic applications.
- (iii) Furthermore, HSP interactions with labeled proteins/peptides can be detected, resulting in the possibility to screen the client binding site of HSP as a further potential target site for drug development.

5.1.3. Results and Discussion

Purified HSPs (human HSP90a, plant AtHSP83, *H. pylori* HtpG) have been printed in parallel onto a microarray surface. Fluorescently (Cy3) labeled ATP directly competed with different natural product derived heat shock protein inhibitors. These natural products were accessed by a combination of chemical synthesis and mutational biosynthesis

[20, 111, 112]. The potential inhibitors were applied in different concentrations ranging from 50 μ M to 50 pM and the data collected were used to calculate IC_{50} values as described by Schax *et al.* [111]. Figure 5.2a exemplifies the results of the competition assay for purified AtHSP83. It could be demonstrated that an efficient competition between labeled ATP and the used geldanamycin derivative 17-AAG and bromo-reblastin occurs (Fig. 5.1) as indicated by the calculated IC_{50} values of 291 nM for 17-AAG and 79 nM for bromo-reblastin (Fig. 5.2a). It was demonstrated that compounds 2 and 3 were also able to effectively displace the labeled ATP from purified HSP83 from *A. thaliana* (Fig. 5.2a). The results of screening several potential inhibitors against human and bacterial HSPs are summarized for comparison in the heat map shown in Figure 5.2b. Our results indicate that it is possible to compete labeled ATP with different efficiencies for different HSPs. Using the HSP microarray new compounds that bind specifically to one of the HSPs were identified from a small drug library synthesized and characterized as described recently [20, 111, 112].

The HSP microarray has the advantage to allow the multiplexed testing of an 'HSP-zoo' composed of different HSPs derived from different organisms against a large arsenal of potential drugs. The HSP microarray is a novel miniaturized assay system used for determining inhibition of the ATP-binding pocket in HSPs from human (HSP90 α) as well as bacterial sources (HtpG from *H. pylori*) by small molecules and this could potentially allow HSP screening under high throughput conditions. An important outcome of this preliminary study is the observation that drug candidates derived from benzoquinone geldanamycin like 17-AAG are selective between human HSP, plant HSPs and bacterial HtpG [38]. This assay will allow us to search for small molecules that selectively inhibit pathogenic bacteria HSPs [38] and not the human HSP90 α .

To explore prospective diagnostic applications of the HSP microarray, we have investigated the potential of the microarray to directly estimate the HSP level by printing of cancer cell lysates. Cancer cell lysates were printed on the microarray, and it could be shown that the labeled ATP was competed by a geldanamycin derivative 18-dehydrox-19-fluoro-reblastatin (Fig. 5.2c). Interestingly, the geldanamycin derivative 18-dehydrox-19-fluoro-reblastatin (Fig. 5.1), which is fluorinated at the phenyl-ring, is a strong competitor of ATP of all investigated HSPs with different displacement potencies [38].

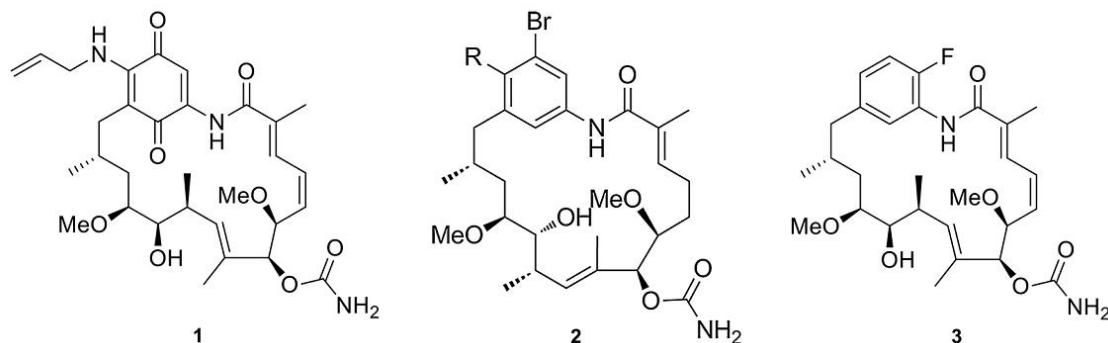


Fig. 5.1 Structures of 17-AAG (1) and the non-quinone geldanamycin bromo-reblastin derivative (2) and 18-dehydro-19-fluoro-reblastatin (3).

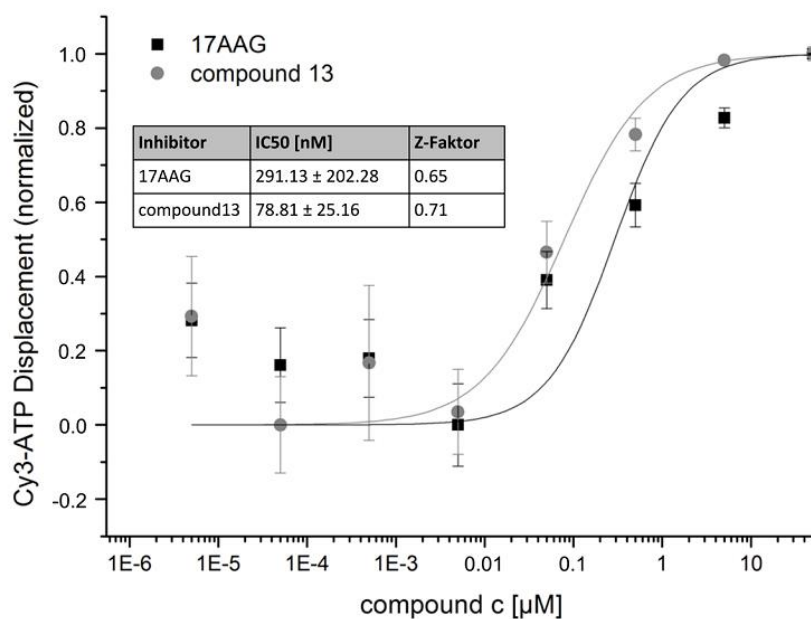


Fig.5.2a Typical displacement assay of Cy3-ATP on AtHSP83 by geldanamycin derivative. Purified AtHSP83 was printed on the microarray surface and Cy3-ATP was competed by a geldanamycin derivative, synthesis and properties given in Schax *et al.*, [13]. The IC₅₀ value was obtained from dose-response curve fittings.

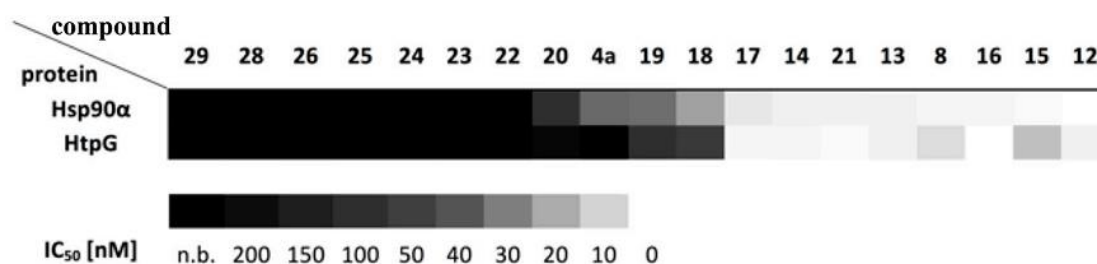


Fig.5.2b Heat map of the calculated IC₅₀ values of HSP90α from *H. sapiens*, HtpG from *H. pylori* and HSP83 from *A. thaliana* for several tested potential inhibitors in a competitive displacement assay. Numbers as indicated have been described before [13]. Different grey tones from black to white indicate the potency of the inhibitor. White corresponds strong inhibitory effects, whereas black shows no effects for the competition with ATP for the binding pocket.

This demonstrates the possibility to test individual tissues for HSP levels and broadens the applicability of the HSP microarray for the diagnostic field using human HSP90 α as a cell stress marker and perhaps also in plant tissues. This may also enable the detection of HSP-related cancer cells in liquor or tissues after tumor dissection. While the above mentioned applications of the HSP microarray exploit the binding of ATP and corresponding inhibitors to the ATP binding site of HSP, HSP offers more sites that could be used as drug binding sites. One of these sites is the client binding site. To investigate whether the full-length human HSP90 α printed on the microarray is able to bind client proteins, we have screened the binding of different proteins in native and denatured form (Fig. 5.3). Luciferase, plant calmodulin and bacterial potassium channel KcsA were tested as potential client proteins; the proteins were purified and labeled with Cy3. Denatured proteins were obtained by heat denaturation and binding of denatured proteins was compared to binding of native proteins. All binding tests were performed under different conditions, only the presence of Tween20 enabled binding, whereas other detergents (octyl glucosid, triton X100, or NP40) or no detergent in the binding buffer did reduce client binding completely. It could be shown that heat denaturation was not required for KcsA binding. In case of luciferase, only the denatured protein binds to the printed HSP90, while no binding of native luciferase was observed. This indicates the specific binding of the denatured protein to the client-binding site of HSP, which is expected to show increased binding of denatured and thus misfolded proteins.

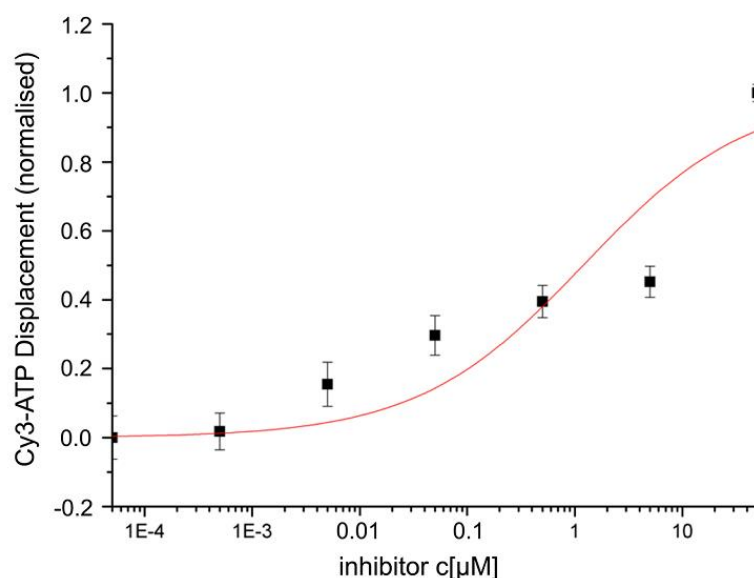


Fig.5.2c Competitive assay of Cy3-ATP by geldanamycin derivative 18-dehydrox-19- fluoro-reblastatin [111] on cancer cell lysates. Concentrated human cancer cell lysate obtained from cell culture was printed on microarray surface and bound Cy3-ATP was competed by a geldanamycin derivative. The IC₅₀ value was obtained from dose-response curve fittings.

In contrast, denatured or native calmodulin does not bind to HSP90. Since HSP90 detects unfolded proteins only, a higher heat stability of calmodulin may explain the loss of binding. The successful binding of the other proteins to HSP indicates that the client-binding site of printed HSP90 is active and could serve as an additional target-site for screening of drug compounds.

In summary, the described HSP microarray bears the potential to screen against HSP derived from further sources including other pathogens and plants. Target-oriented screening was successfully used to estimate HSP levels in cancer cell lysates to enable diagnostic application, which may serve as a novel stress test. The microarray could thus enable a direct testing of tumor tissues after dissection from patients. The tissue is lysed and printed onto the microarray for determination of an inhibitor profile against the complete the ATP proteome including elevated protein concentrations of Hsp90 in the case of some cancer types. At this point it is a diagnostic tool and indicates whether the tumor has modifications from TP53 and corresponding HSP pathways (50% of all cancer types) with the possibility to give a prognosis and choice and for subsequent therapies (this is under development together with the Medical High School Hannover, MHH; pers. comm.). This is a strategy to develop tools for personalized medicine with applications for other dissected materials or liquors from patients. In addition to the well-characterized ATP binding site of HSP90, other HSP90 sites can be tested e.g. by binding of client proteins or co-chaperones to improve novel drugs against the corresponding binding sites. As a main advantage, the concept of the assay is general and should be transferable to other ATP-dependent HSPs and enzymes.

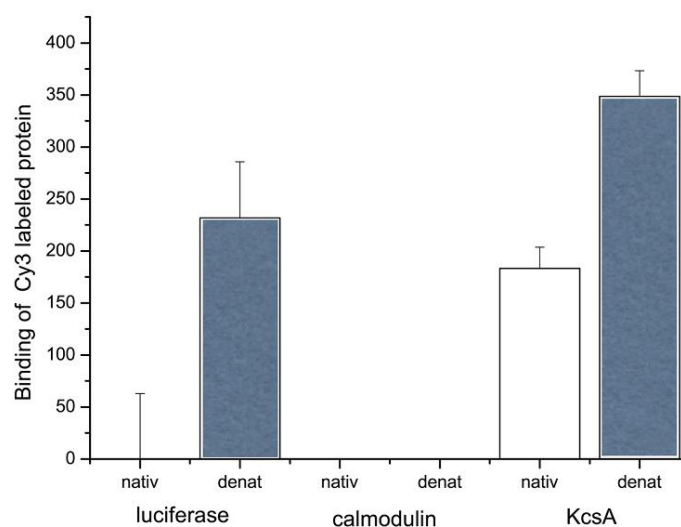


Fig. 5.3 Binding of labeled potential client proteins to HSP90 α . Signal intensities were analyzed at the wavelength 532 nm with a gain of 200.

5.1.4. Experimental Section

5.1.4.1. Preparation of geldanamycin derivatives

All geldanamycin derivatives, except for 17-AAG, used in this study were obtained as previously reported [20, 111]. The synthetic strategy relied on mutasynthesis using a mutant strain of *S. hygroscopicus* var. *geldanus* that was blocked in the biosynthesis of the starter unit, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) [20]. 17-AAG and radicicol are commercially available (Biomol).

5.1.4.2. Protein preparations

The cDNA of HSP83 from *A. thaliana* was cloned into a petSUMO plasmid, transformed into the *Escherichia coli* Rosetta strain, overexpressed and purified as previously described [111]. Synthesis and purification of the target proteins HSP90 α and HtpG from *Helicobacter pylori* were produced as described before [111] and the putative clients were produced in *Escherichia coli*. The bacterial potassium channel was produced and purified as described by Barbier *et al.*, [113]. The firefly luciferase was obtained after transformation of the pBest-Luc (Promega) into *Escherichia coli* B121DE3 strain and luciferase activity was tested after purification as described by [114]. The cDNA of calmodulin was cloned into pTrcHis2TOPO plasmid, transformed into the *Escherichia coli* B121DE3 strain. Purified proteins were frozen at a concentration of 1-3 mg·ml⁻¹ in liquid nitrogen and stored at -80°C.

5.1.4.3. Direct competitive assay

The HSP microarray assay was performed as described by Schax *et al.* (2014), using 4 x 5 matrices of proteins printed on UniSart[®] 3D nitro slide (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) using a GeSim Nano-Plotter[™] (GeSim, Grosserkmannsdorf, Germany) equipped with a nanotip pipette. The printed proteins on the slides were incubated directly with a mixture of 100 nM Cy3-ATP and potential inhibitors. The potential inhibitors were used in different concentrations ranging from 50 μ M to 50 pM. The competitive assay was carried out in binding buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Na₂MoO₄, 0.01% v/v Tween 20, 2% v/v DMSO, 0.1 mg·ml⁻¹ BSA) for 16 h at 4°C. Detection of the bound labeled ATP was performed using a GenePix 4000B Laser Scanner (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) with 532 nm emission

wavelength, laser power 33 %, PMT gain 350. Quantification was performed using GenePix Pro 6.1 (Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) and ImaGene 5 of BioDiscovery, Inc. (Hawthorne, CA, USA). The dose-response curves were calculated with Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and fitted with the non-linear function logistic, $A_1=0$, $A_2=1$ to obtain IC_{50} values.

5.1.4.4. Cell lysate preparation

The frozen cell pellet consisting of 10^5 A549 cells were thawed on ice and resuspended in 100 μ l phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , and 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4). Afterwards they were mixed with 1 ml of Tris-buffered saline (50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl). The lysis of the cells was performed on ice with ultrasonic energy (pulse duration 0.6 sec, 5 repeats à 30 sec, and break in-between of 60 sec). The cell debris were removed by centrifugation at 14,000 xg, 4°C and for 30 min. Using centrifugal concentrators with a polyethersulfon membrane, pore size 0.2 μ m (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany), the supernatant was filtered for 3 min at 4°C at 14,000 xg. The collected flow-through was concentrated with the help of an ultrafiltration unit (polyethersulfon membrane) with a molecular weight cut-off of 10 kDa (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) at 14,000 xg for 20 min at 4°C. Furthermore, the buffer was exchanged to storage buffer (20 mM Tris- HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 10% v/v Glycerin, 6 mM 2-mercaptoethanol) and the concentration of protein in the final solution was 2.52 mg·ml⁻¹.

5.1.4.5. Protein labeling and binding to HSP90 α

Purified Luciferase, calmodulin and KcsA were labeled with Cy3 (Cy3 Mono-Reactive Dye Pack, Amersham, Piscataway, NJ) at a protein concentration of 1 mg·ml⁻¹ as described by Walter *et al.* [115] and unbound label was removed through centrifugal concentrators with a cut-off of 10 kDa. The resulting Cy3/protein-ratios were 0.04 for calmodulin, 0.33 for KcsA, and 1.65 for luciferase. Before incubation with printed HSP90 α one fraction of the labeled proteins were denatured at 45°C for 10 min. Prior incubation with printed HSP90 the protein concentration of each potential client protein was adjusted to 2 ng· μ l⁻¹ in 20 mM Hepes, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM Na_2MoO_4 , 1mM DTT, 0.01 % Tween20, 1 mg·ml⁻¹ BSA, pH 7.3. For each client protein, native and denatured forms of labeled protein were incubated onto the microarray over night at 4°C. The microarrays washed with 20 mM Hepes, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM

Na_2MoO_4 , 1 mM DTT, 0.01 % Tween20, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA, pH 7.3 for 10 min three times. The evaluation of the binding and treatment of the slides was performed as described before [111].

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) in several ways: grant Ki 13-1. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of Leibniz Universität Hannover.

6. Aptamer-basierte Abreicherungen und Bindungsuntersuchungen von einem toxischen *small molecule*

Das Interesse an der Detektion und Abreicherung von *small molecules* wie Mykotoxinen und Pestiziden steigt in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie in den letzten Jahren zunehmend an und Aptamere rücken immer mehr in den Fokus als biologische Erkennungssysteme. Die chemisch synthetisierten RNA- oder DNA-Oligonukleotide binden sensitiv und spezifisch ihre Zielmoleküle und weisen viele Vorteile als Detektionsmolekülen gegenüber Antikörpern auf. In dieser Publikation wird exemplarisch ein System für die Aptamer-basierte Abreicherung von Ochratoxin A (OTA), einem Mykotoxin der *Penicillium* und *Aspergillus* Pilzstämmen, präsentiert. Außerdem wird auf die Vorteile und Einschränkungen von Aptamer-basierten Verfahren zur Abreicherungen und Detektion von *small molecules* eingegangen.

Das in der Literatur gut beschriebene OTA-Aptamer 1.12.2 wurde auf ein Agarosegel mit einer Stoffmenge von 14,81 nmol Aptamer/200 µl Gel (Effizienz von 92,5%) immobilisiert und in einer Durchflusssäule zur Abreicherung von OTA verwendet. Anschließend konnten 90% des aufgegebenen OTAs von der Aptamer-modifizierten Säule gebunden und 76,5% wieder mit einem Tris-EDTA-Puffer eluiert werden. EDTA komplexiert einwertige Kationen des Bindungspuffers und instabilisiert somit die Aptamerstruktur und das OTA wird frei gegeben. Die Versuchsdurchführung wurde hinsichtlich der Kosten und des Zeitaufwandes optimiert, sodass das Verfahren wirtschaftlicher wurde. Die verwendete Säule konnte vier Mal innerhalb von 20 Tagen ohne Einschränkung der Aptameraktivität verwendet werden. Des Weiteren wurde die Spezifität und Sensitivität des Aptamers gegenüber seinem Zielmolekül OTA untersucht. Dafür wurde einerseits auf der Erkennungsmolekülebene ein Oligonukleotid verwendet, das eine ähnliche Struktur zum Aptamer 1.12.2 aufweist. Die Guaninbasen des Aptamers 1.12.2 wurden durch Cytosin-Nukleinbasen ersetzt. Das Aptamer 1.12.2 bildet mit Hilfe der Guanine und Kationen auf dem Bindungspuffer eine dreidimensionale G-Quadruplex und unterstützt dadurch die Bindung von OTA an das Aptamer. Das OTA konnte nicht von dem Oligonukleotid gebunden werden. Das OTA wurde in den Waschfraktionen der Säule wiedergefunden. Andererseits wurde auch die Spezifität des Aptamers auf der Zielmolekülebene untersucht, statt des OTAs wurde das Strukturanalogon Ochratoxin B (OTB) verwendet. OTB unterscheidet sich von OTA nur in einer Position, am Kohlenstoffatom C5 ist ein Chloratom durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Auch in diesem Fall konnte keine

signifikante OTB Bindung detektiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder das Aptamer 1.12.2 mit OTB interagiert, noch OTA spezifisch von einem negativen Kontrolloligonukleotid gebunden werden konnte.

Darüber hinaus wurden entgaste Bierproben mit zugesetztem OTA als komplexes Medium verwendet, da OTA häufig in Getreide verarbeiteten Produkten vorkommt. Die Bierproben wurden auf die Aptamer-modifizierte Säule aufgetragen. Es wurde mit Hilfe von Abreicherungsversuchen und der Microscale Thermophoresis (MST) gezeigt, dass sich die Aptameraktivität in komplexeren Medien, die in ihrer Zusammensetzung und in ihrem pH-Wert vom Selektionspuffer abweichen, verändert. Die mittels der MST ermittelten Dissoziationskonstanten variieren von 32,5 nM in Selektionspuffer und 210 μ M in reinen entgasten Bier (pH 4.5). Dabei hatte das Ethanol im Bier keinen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der Dissoziationskonstante. Dies wurde in MST-Versuchen mit 4% und 12% Ethanol in Bindungspuffer bestätigt. Die Aptamer-basierten Abreicherungen von OTA aus Bier konnten ohne signifikante Verluste der Aptameraktivität durchgeführt werden, wenn ein Teil Bier und ein Teil Bindungspuffer als komplexes Medium verwendet wurden. Es konnte 92% des aufgetragenen OTAs erfolgreich von der Aptamer-modifizierten Säule gebunden werden. Anders war es bei reinem Bier, es konnten nur noch 21% des OTA von den Aptameren gebunden werden.

In weiteren MST-Versuchen wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Bindungsaffinität des Aptamers gegenüber OTA untersucht. Dafür wurde der pH-Wert des Biers von 4,5 auf 8,5 eingestellt, da der Bindungspuffer des Aptamers einen pH-Wert von 8,5 hat. Der ermittelte K_D -Wert sank für reines Bier pH 8,5 von 210 μ M auf 4,61 μ M. Dies wurde auf andere komplexe Proben (Wein, klarer Apfelsaft, Kaffee) übertragen. Auch hier ließen sich K_D -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich feststellen (2,60 - 4,81 μ M). Der pH-Wert hat somit einen bedeutenden Einfluss auf die Aptameraffinität, während die Zusammensetzung der komplexen Probe diese nicht so stark beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendungsmöglichkeiten von Aptameren als biologische Erkennungssysteme für *small molecules* bisher auf die Verwendung des Bindungspuffers limitiert sind. In abweichenden Medien verschlechtert sich die Aptameraffinität deutlich. Um die Aptamere auch in realen Proben verwenden zu können, müssten die Bedingungen in dem Selektionsprozess des Aptamers näher an diese herangeführt werden.

6.1. Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A

Emilia Schax^a, Maren Lönne^a, Thomas Scheper^a, Shimshon Belkin^b, Johanna-Gabriela Walter^{a*}

^aInstitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany. Tel: +49-511-762-2955, Fax: +49-511-762-3004, E-mail: walter@iftc.uni-hannover.de

^bInstitute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

Reprinted from *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (2015) 20:6, p. 1016-1025, DOI: 10.1007/s12257-015-0486-1 with kind permission of Springer.

6.1.1. Abstract

Based on the increasing demand for detection and depletion of small molecules like mycotoxins or pesticides in food, water, or pharmaceuticals, aptamers are gaining more importance as sensitive, specific-depletion molecules. Here, we present an aptamer-based method for depletion of ochratoxin A (OTA) as a model system and show the advantages and the limitations of aptamers in the depletion of small molecular contaminants. OTA is a mycotoxin produced by various *Penicillium* and *Aspergillus* strains and is often found in grain and grain derivatives.

We immobilized a well-described DNA aptamer against OTA on an agarose gel and used the column as a clean-up system. The aptamer shows a high specificity and sensitivity for OTA: Ochratoxin B, a molecule similar to OTA, was not bound by the aptamer; and a control oligonucleotide was not able to bind OTA. After optimizing the process for better economic feasibility, the column could be used for several times without loss of aptamer activity. We investigated the location of immobilized aptamer within the gel using fluorescent-labeled aptamers. Furthermore, beer samples spiked with OTA were used to investigate aptamer activity in complex samples. Using these complex samples we have observed a significant loss of aptamer activity. We have further investigated this limitation by performing microscale thermophoresis experiments to determine the K_D values of the aptamer in different complex samples like beer, coffee, juice and wine. Our results indicate that the applicability of aptamers to real processes is currently restricted by the selection buffer used during its selection process (SELEX). We therefore suggest using

conditions closer to those of the later application of the aptamer during future SELEX experiments.

Keywords: *Aptamer, Ochratoxin A, downstream processing, affinity separation, affinity depletion, Microscale thermophoresis*

6.1.2. Introduction

For safety and quality assurance in the food or pharmaceutical sector aptamers are supposed to be suitable ligands for biosensing and depletion of small molecules or pathogens [1, 116-119]. The word aptamer is built up from the Latin word *aptus* (= fit) and the Greek word *meros* (= part). Aptamers are short single stranded DNA or RNA oligonucleotides, which are able to recognize their target with high affinity and specificity because of their defined three-dimensional folding. Target binding is achieved via a combination of electrostatic interactions, van der Waals forces and hydrogen bonds [120]. Aptamers are developed *in vitro* through a selection process called SELEX (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment), which can be performed under diverse buffer conditions [29, 30, 121]. Further, they are produced by chemical synthesis, have a high chemical stability, low immunogenicity and a wide range of possible targets. Easily, a chemical modification can be attached to the aptamers and they can be immobilized on various surfaces like magnetic beads, agarose gels, sensors or microarrays [115, 122-124]. Due to these advantages, aptamers may displace antibodies in future affinity chromatography applications [125-127].

The following molecules can be used as targets for aptamer development: whole cells, proteins, peptides, hydrocarbonates, antibiotics, as well as anorganic and small organic molecules [128]. By definition “small molecules” have a molecular weight below 800 Da which enables them to cross the cell membranes of humans and animals easily [1]. Aptamers directed against these molecules gained more and more importance during the last years [96, 117, 129, 130]. They can be selected for various small analytes including those with high toxicity or low immunogenicity. Small molecules are involved in many biological processes, they can be drugs or nutrients but they can also represent toxic substances like pesticides or mycotoxins. The demand for detection and depletion of small molecular food contaminants, like mycotoxins and pesticides, is growing immense as a consequence of the gained knowledge of their toxic effects [131]. Until now, 400 different toxic mycotoxins could be identified [55]. The mycotoxin ochratoxin A (OTA) is produced by two

main genera of filamentous fungi *Aspergillus* and *Penicillium* and is often found in contaminated grain and grain derivatives like bread and beer [132]. Wine is also affected as the second important contamination source for humans. The contamination can arise during the growth, harvesting, storage and processing of plants [55, 133]. In 2012 the European Union has established a regulation of a tolerable weekly intake per person of 120 ng OTA per kg of body weight [134]. In 2008, Cruz-Aguado and Penner have selected a DNA aptamer against OTA with a dissociation constant in the nanomolar range [54]. Since that time, many detection methods have been published; among others, an enzyme-linked aptamer assay, a biosensor based on structure-switching signaling aptamers or an approach of detecting OTA by fluorescence anisotropy [58, 135, 136]. Biosensing of OTA with an aptamer was previously investigated and is therefore well known [54, 55, 57, 137]. For example, Castillo *et al.* have developed an impedimetric DNA aptasensor, which is highly sensitive and can be regenerated for subsequent use. They have validated their sensor using spiked coffee, wine, and flour samples [138]. The analytical extraction of OTA from spiked beer samples by using a cyanogen-bromide-activated sepharose, instead of carboxyl-linked agarose, which Cruz-Aguado *et al.* have used before, was optimized by Rhouati *et al.* (2013). Additionally, they have shown that the recovery yield does not decrease after regenerating the sepharose for several times [63]. De Girolamo *et al.* (2011) also developed a reusable solid phase extraction column using immobilized anti OTA aptamer that could be applied to OTA contaminated wheat samples. Furthermore, they confirm that 15% of methanol in the loading fraction of the column does not affect the binding affinity [61].

In contrast to previously described analytical applications, we present in this work the depletion of a small molecule with an aptamer column as an effective and specific clean-up model. We hypothesize that aptamer-based affinity separation could be useful for the depletion of small molecules even from complex samples. Therefore, we concentrate on aptamer-based downstream processing of small molecules using well-characterized aptamer-based OTA depletion as a model system. The process may be transfer to other aptamers targeting small molecules, resulting in a platform for either purification of valuable small molecules, as well as for the depletion of contaminants [129]. The aptamer 1.12.2 against OTA was chosen as model system because of its reliable affinity and specificity demonstrated in several publications. The aim was to study the immobilization of aptamer to the material with special regard of the distribution of immobilized aptamer within the material. Furthermore, we investigated the elimination of OTA from several

complex samples and calculated the recovery yield and the change of the K_D values of the aptamer in the complex samples is described. The reusability of the column was tested consecutively four times. Potential application of aptamers, their advantages as well as current limitations are discussed.

6.1.3. Materials and Methods

6.1.3.1. Chemicals and DNA oligonucleotides

Ochratoxin A and B were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). OTA was dissolved in 100% DMSO and stored with a concentration of 2.48 mM at 4°C in the dark. Ochratoxin B (OTB) was purchased in acetonitrile (10 µg/ml). For analysis the toxins were diluted with binding buffer consisting of 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM, KCl and 20 mM CaCl₂ and a pH of 8.5, which corresponds to the selection buffer of the aptamer 1.12.2 [54]. The CarboxylLink™ Coupling Gel was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). The single-stranded DNA aptamer (1.12.2) 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-'3 against ochratoxin A isolated by Penner *et al.* (2008), the negative control oligonucleotide (NCO) 5'-CAT-CCC-CTC-TCC-CTC-CCC-TAA-ACC-CAG-CAT-CCC-ACA-'3 and the 3'-Cy3-labeled, as well as the 5'-Cy5-labeled aptamer 1.12.2 were purchased by Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA). The oligonucleotides were dissolved in ultra-pure water and kept at 4°C for storage. For the elution process TE-buffer was used (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)). All buffer salts were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solutions were prepared with deionized water (ARIUM, Satorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany).

6.1.3.2. Immobilization of oligonucleotides and quantification of the aptamer-functionalized agarose gel

First, the aptamer 1.12.2 as well as the oligonucleotide NCO were immobilized on a solid surface. Using the 5' phosphate group of the single stranded DNA, it was possible to link the oligonucleotides on the modified diamino-dipropylamine (DADPA) CarboxylLink™ Coupling Gel according to the manufacturer protocol with slight modifications. In brief, the gel was suspended by end-over-end rotation and for each experiment 400 µl uniform gel suspension was transferred in a 1.5 ml microcentrifuge tube; 400 µl suspension accord to 200 µl agarose gel. The tube was centrifuged for 2 min at 1000 xg (Micro STAR 17R,

VWR International, LLC, Radnor, USA) to let the gel settle down and the supernatant was removed carefully. Afterwards the gel was washed three times with ultrapure water for 10 min each and one time with 0.1 M imidazole, pH 6. The washing steps were performed under rotation at 20 rpm (Shaker Rotator Bio-RS-24, Peqlab, Erlangen, Germany). In between the washing steps the gel was centrifuged and the supernatant removed each time. N'--(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC hydrochloride) was utilized as coupling agent between the amino-groups on the agarose and the phosphate end of the oligonucleotides. The mixture for oligonucleotide coupling contained 112.3 μl aptamer (288.9 μM in ddH₂O), 75 μl 0.1 M imidazole (pH 6), 200 μl EDC (156 mM in 0.1 M imidazole, pH 6), and 200 μl agarose gel. The coupling was performed under rotation at 20 rpm at room temperature for 3 h. To separate the gel from the solution, the gel was centrifuged for 2 min at 1000 xg. After the incubation with oligonucleotides, the gel was washed three times for 10 min each with 200 μl binding buffer (10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl and 20 mM CaCl₂, pH 8.5), to remove unbound oligonucleotides. The original solution, the supernatant after the incubation with the gel and all washing fractions were analyzed with a NanoDropTM 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) by using the respective buffer as blank. At a wave length of $\lambda = 260$ nm the absorbance of single-stranded DNA was measured and subsequently the concentration was calculated based on the Lambert-Beer equation utilizing an extinction coefficient of 363.4 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (1.12.2) and 303.5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (NCO), respectively. The amount of aptamers immobilized on the gel was calculated as the difference of the quantity of the oligonucleotide used for coupling and the sum of the quantities remaining in solution after the incubation step and the washing steps. The amount of the immobilized aptamer and NCO was 36.50 nmol for the first depletion experiments including the reuse of the clean-up column. For later experiments 16 nmol aptamer per 200 μl gel was used, if not indicated otherwise. The gel was stored in binding buffer at 4°C.

6.1.3.3. Depletion, elution and quantification of OTA

A 1 ml barrier pipette tip (Biozym Biotech Trading GmbH, Austria) served as a gravity flow column for the development of an OTA depletion process. 200 μl aptamer-modified gel was used per experiment and was applied to the barrier tip. The concentration of OTA in binding buffer and beer was 100 nM, respectively. The beer was degassed in an ultrasonic bath for 20 min before use. 1 ml of the OTA-containing solution was given to the

aptamer modified column. After incubation with OTA, the gel was washed five times with 1 ml of binding buffer to remove unbound and nonspecifically bound OTA. Afterwards, the elution of bound OTA was performed with TE-buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) for eight times with 1 ml, respectively. The flow-through, as well as all washing and elution fractions were analyzed via HPLC to determine the concentration of OTA. Furthermore, the volume of each fraction was analyzed to determine the total amount of substance.

6.1.3.4. HPLC analysis for OTA/OTB quantification

For the chromatographic quantification of OTA and OTB by HPLC, an Eclipse XDB-C18 column from Agilent technology (Santa Clara, USA) (5 μm x 4.6 μm x 150 mm) was used. The flow rate was 1 ml/min and the separation was carried out isocratic with an eluent containing acetonitril/H₂O/acetic acid (45.5%/ 45.5%/ 1% v/v/v). The temperature of the column was 40°C and 10 μl sample was injected. A fluorescence detector was used to exploit OTA and OTB fluorescence with an extinction of 330 nm and emission of 470 nm. For each buffer (binding and TE-buffer) and each substance (OTA and OTB) a calibration curve was recorded (supplementary information, Fig. 6.7 and Fig. 6.8) and used for quantification.

6.1.3.5. Investigation of aptamer immobilization and functionality

Aptamer 1.12.2 labeled at the 3' terminus with cyanine dye (Cy3) was immobilized to the chromatography material via the 5'-phosphate group as described before. We used different concentrations of aptamer (16 and 72 nmol per 200 μl gel) to investigate the immobilization of the aptamers within the agarose matrix in dependency of the aptamer concentration. After an incubation time of 3 h, the gel mixture with labeled aptamers was washed five times with 200 μl binding buffer and was afterwards stored at 4°C. In order to assess the functionality of immobilized aptamers by means of their ability to bind their target, the experiment was repeated with unlabeled aptamers. Unlabeled aptamer (16 and 78 nmol per 200 μl gel) and NCO (78 nmol per 200 μl gel) were immobilized to the gel as described before. After washing, 100 pmol and 400 nmol OTA, respectively, were incubated for 1 h, 6 h and 24 h under rotation of 20 rpm (Shaker Rotator Bio-RS-24, Peqlab, Erlangen, Germany). The analysis of the location of immobilized Cy3-labeled aptamer and bound OTA was performed via confocal microscopy (LSM 510 META, Zeiss, Jena, Germany). The Cy3 was excited with a 543 nm laser and a transmitted light

filter and band pass filter of 420-480 nm was used, respectively. For the detection of OTA a 405 nm argon laser and a transmitted light filter and long pass filter of 420 nm was used, respectively.

6.1.3.6. Microscale thermophoresis experiments

To determine the binding constants for the aptamer 1.12.2 to OTA in different buffer conditions, microscale thermophoresis (MST) experiments were performed. Starting from 100% binding buffer, the percentage of added beer was increased until 100% beer was used as incubation buffer. The beer was degassed in an ultrasonic bath for 20 min before use. The aptamer 1.12.2 was labeled with a Cy5-dye at the 5'-end. The fluorescently labeled aptamer had a constant concentration of 25 nM in all MST experiments and concentration of OTA was varied by serial dilution. The starting concentration of OTA was varied depending on the used buffer mixture (10 μ M – 1.24 mM), because the highest concentration of the ligand should be 20 times above the expected K_D for MST measurements. Before the measurements, aptamer and OTA were incubated at room temperature for 5 min. The experiments were performed with the Monolith NT.115 (Nanotemper Technology GmbH, Munich, Germany) and 40% MST-Power at room temperature. For the other samples (white wine, coffee, and apple juice) the same protocol was performed, and the pH values for the complex samples were adjusted to pH 8.5. For analyzing the data, the program NT.Analysis Software (Nanotemper Technology GmbH, Munich, Germany) was used. The curves were fit to determine the K_D values using the K_D model of the NT.Analysis Software and the graphs were afterwards drawn with Origin 7G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

6.1.4. Results and Discussion

6.1.4.1. Depletion of OTA with an aptamer clean-up column

To prove the applicability of aptamer-modified gel matrices for OTA capture, the aptamer-based column was used as described before by Cruz-Aguado *et al.* [54] We focused on the depletion process and the reusability of the column to use it as a clean-up column for OTA-contaminated liquids as beer. The aptamer 1.12.2 directed against OTA was immobilized via the 5' phosphate group of the oligonucleotide on the modified DADPA CarboxylLinkTM Coupling Gel. The aptamer reacts with the amino group of the DADPA and EDC was used as coupling reagent. 97.71% of the given aptamer (36.50 nmol/200 μ l gel) could be immobilized on the gel, which is equivalent to 35.66 nmol per 200 μ l gel.

The clean-up process for depletion of OTA was performed in a gravity flow column. An amount of 91.10 nmol OTA in a volume of 1 ml binding buffer was added to the aptamer-modified gel and to the negative control consisting of gel modified with an oligonucleotide (NCO) not capable to bind OTA. The incubation time of OTA and aptamer was one minute. Afterwards, the column was washed six times with 1 ml binding buffer, respectively to ensure the complete elimination of unbound OTA out of the column. The samples were analyzed via HPLC using a fluorescence detector. The OTA aptamer was able to capture 93.79% of the applied OTA (85.57 pmol/200 μ l gel), which proves a successful OTA depletion from the binding buffer.

The elution was performed with 250 μ l TE buffer, pH 9, containing EDTA as a chelating agent which removes the divalent cations in solution. Yang *et al.* (2011) and Gen *et al.* (2013) reported that the presence of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and Na^+ ions stabilizes the aptamer 1.12.2 in its functional three-dimensional structure and enhances the binding affinity towards OTA [55, 135, 139]. Addition of EDTA thus leads to aptamer unfolding and consequently to target release. We have applied this elution strategy successfully, as 84.41% (72.23 pmol/200 μ l gel) of the aptamer-bound OTA could be eluted after the depletion process. In Fig. 6.1 data series “t0” show the results of this experiment.

6.1.4.2. Reuse of the aptamer column

In the next step, we tested the reusability of the aptamer-modified column and used it four additional times within 20 days ($t_0 = 1^{\text{st}}$ day, $t_1 = 2^{\text{nd}}$ day, $t_2 = 8^{\text{th}}$ day, $t_3 = 15^{\text{th}}$ day, $t_4 = 20^{\text{th}}$ day). In the time in-between the depletion processes, the column was washed intensively with binding buffer to ensure refolding of the aptamer and afterwards stored at 4°C in binding buffer. The depletion cycles were performed in the same way as described before. As shown in Fig. 6.1, the OTA binding capacity of the aptamer column remained stable during the investigated period of 20 days and the amount of eluted OTA did not change significantly.

The amount of aptamer-bound OTA was between 84-94% for the five experiments. All cycles show the same washing and elution profile and confirm the stability of the aptamer-modified column. The elution efficiency was between 71-84%. Small changes in the washing and elution profile originate from differences in the starting OTA concentrations. Consequently, the column can be used in the clean-up process for several times.

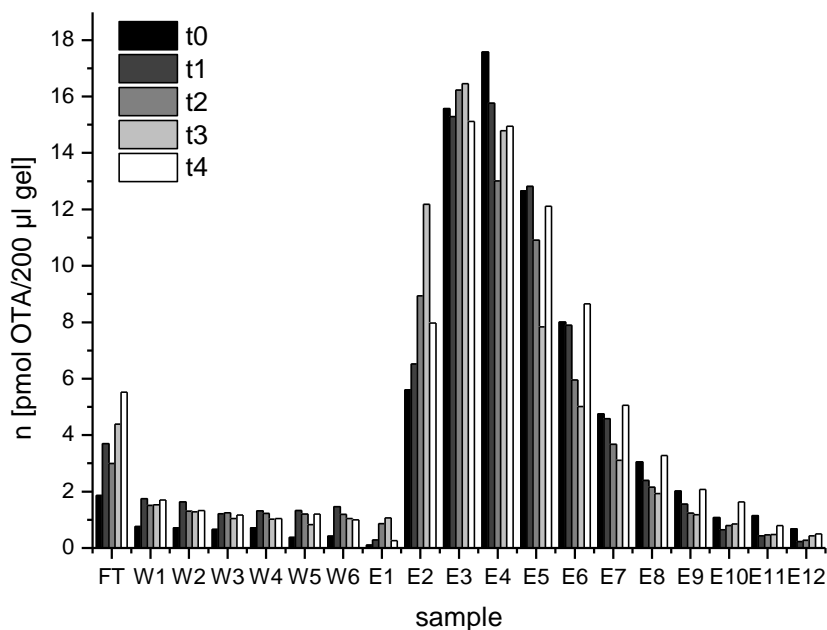


Fig. 6. 1 Reuse of the aptamer-modified clean-up column for four times: t0 = 1st day, t1 = 2nd day, t2 = 8th day, t3 = 15th day, t4 = 20th day. The amount of OTA is plotted in pmol/200 μ l gel on the y-axis. Six washing steps with 1 ml binding buffer and 12 elution steps with a volume of 250 μ l TE-buffer, pH 9 were performed (x-axis). The nomenclature is the following: FT: Flow-through, W: Wash fraction, E: Elution fraction.

6.1.4.3. Investigation of the location of immobilized aptamer within the affinity matrix

To localize the aptamer within the gel particle and to analyze if the aptamers are still able to bind OTA if they are located deep inside the agarose beads, we labeled the aptamer 1.12.2 with the cyanine dye Cy3 at the 3' end of the aptamer. In this way, we could detect the immobilized aptamer via confocal microscopy. In addition, we performed OTA binding studies using unlabeled aptamer and predict the binding capacity of the aptamer-modified gel.

The Cy3-labeled aptamer was immobilized on the gel in two different concentrations, one sample with 16 nmol aptamer/200 μ l gel and one with 78 nmol aptamer/200 μ l gel. Afterwards, the gel was washed five times with binding buffer. The dye Cy3 was excited with the laser ($\lambda=543\text{nm}$) of the confocal microscope. Fig. 6.2A presents the result of the measurement. At low concentrations the aptamer is solely immobilized on the outer shell of the bead (A1). With a higher concentration of aptamer also the inner parts of the bead is modified (A2).

In the next step, we investigated if the aptamers are still able to bind OTA. Four different samples of agarose modified with unlabeled aptamer were prepared, one with 16 nmol aptamer/200 μ l gel (B1), two with 78 nmol aptamer/200 μ l gel (B2-B3) and one with

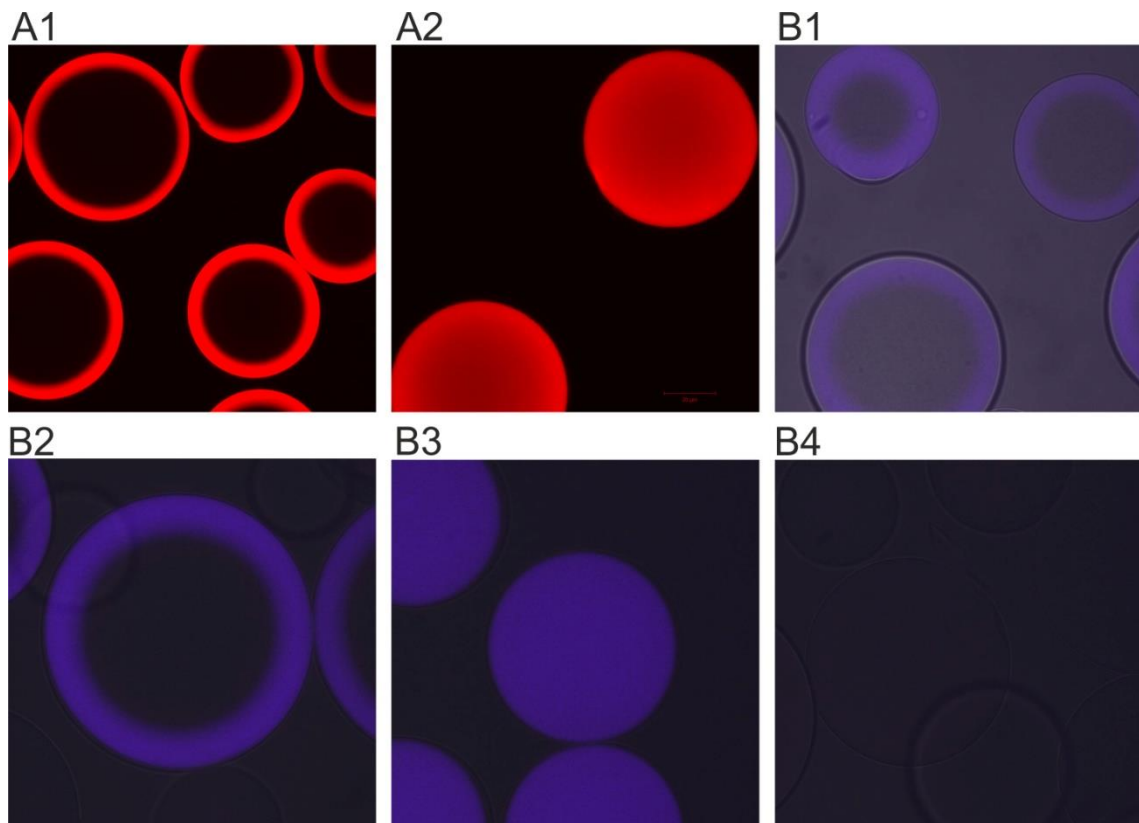


Fig. 6.2 Immobilization of Cy3-labeled aptamer (A) and OTA binding studies using unlabeled aptamer (B) via confocal microscopy.

(A1) 16 nmol immobilized Cy3-labeled aptamer 1.12.2 per 200 μ l gel

(A2) 78 nmol immobilized Cy3-labeled aptamer 1.12.2 per 200 μ l gel

(B1) 16 nmol immobilized unlabeled aptamer per 200 μ l gel with 100 pmol incubated OTA

(B2) 78 nmol immobilized unlabeled aptamer per 200 μ l gel with 400 nmol incubated OTA for 1 h

(B3) 78 nmol immobilized unlabeled aptamer per 200 μ l gel with 400 nmol incubated OTA for 6 h

(B4) 78 nmol immobilized unlabeled NCO per 200 μ l gel with 400 nmol incubated OTA for 6 h

78 nmol NCO/200 μ l gel (B3) as a negative control. The samples were incubated with OTA for 1 h (B1, B2) and 6 h (B3, B4). The used amount of OTA for the first sample was as before (100 pmol OTA/200 μ l gel) and the result is shown in Fig. 6.2B1, OTA emitted violet. It proves that the aptamer binds the OTA specifically and that no OTA is nonspecifically bound in the aptamer-free center of the beads. For the other three samples 400 nmol OTA/200 μ l gel was used. OTA was provided in excess to the beads so that every aptamer had the chance to bind one OTA molecule. As shown in Fig. 2B4, the negative control shows no signal of OTA, as expected. Fig. 2B2 presents the aptamer modified beads; OTA could be detected on the outer surfaces but not inside the beads, although it was five times in excess in the solution.

When we elongated the incubation time for the OTA with the aptamer-modified gel from 1 h to 6 h, we could detect bound OTA also in the inner shell of the agarose beads. This means that OTA could not reach the aptamers inside the beads after a short incubation time because of diffusion limitations. For a good binding capacity, the aptamer should

just be coated on the outer surface or a non-porous material should be chosen. Assuming that every immobilized aptamer of the “16 nmol aptamer gel” is binding one molecule of OTA, it would correspond in a binding capacity of 32.3 μg OTA/ml beads or 27.9 μg OTA/g beads, respectively.

In grain related products like beer, there is a maximum allowed concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EU regulation of commission No. 594/2012). With just one ml of aptamer-modified beads we could deplete 10 times more OTA than the allowed maximum. In conclusion, the aptamers on the agarose beads show the best and fastest activity when they are immobilized on the outer shell of the agarose beads.

6.1.4.4. Optimization of process parameters and investigation of specificity

Based on the previous findings on faster OTA binding within the outer shell of the particles, the used aptamer amount was reduced to 16 nmol aptamer per 200 μl gel. Moreover, the process was speeded up by reducing the amount of washing and elution steps. For the coupling reaction 16 nmol aptamer per 200 μl gel were used corresponding to half of the amount utilized before. Still, the aptamer is present in excess compared to the quantity of OTA. 92.52% of the aptamer was immobilized on the gel (14.81 nmol/200 μl gel). The amount of OTA supplied to the material was 72.16 pmol/200 μl gel, and 89.54% was bound by the immobilized aptamers (64.61 pmol OTA/200 μl gel). The elution volume was increased from 250 μl to 1000 μl , which corresponds to five column volumes (200 μl) per elution step. The amount of elution steps could be reduced from 12 to 8. The largest portion of OTA is released in the steps E1, E2, E3 (in total 63.82% of the bound OTA). In total 76.46% of the bound OTA were detected in the elution fractions.

Furthermore, a negative control oligonucleotide was used in the process to demonstrate the specificity of the aptamer in comparison to a random oligonucleotide (NCO) [135]. This oligonucleotide has a similar nucleotide sequence as the aptamer 1.12.2, only the guanines of the aptamer 1.12.2 were substituted by cytosines. Thereby, the formation of the anti-parallel G-quadruplex in the presence of OTA and a monovalent cations (Na^+ and K^+ of the binding buffer) is not possible and no specific binding of OTA to NCO should occur [59].

We aimed to prove that OTA does not interact nonspecifically e.g. by electrostatic interactions with a random oligonucleotide. The NCO was also immobilized on the coupling gel in a density of 15.06 nmol/200 μl gel and the experiment was performed as described above. After three washing steps 85.63% of the applied OTA (61.79 pmol/200 μl gel)

was recovered in the washing fractions. Afterwards no significant amount of OTA was detected in the subsequent washing and elution fractions. Therefore, no binding of OTA to NCO was observed.

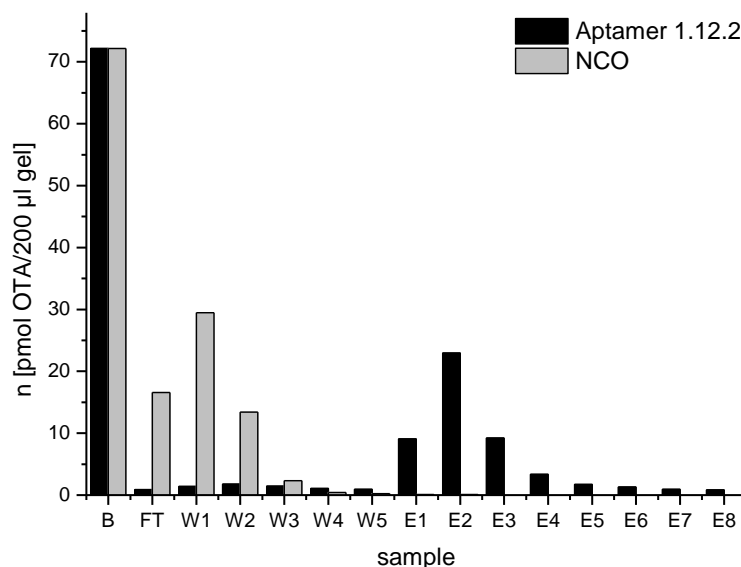


Fig. 6.3 Optimization of the depletion and elution time of OTA with the aptamer 1.12.2 and an oligonucleotide used as a negative control (NCO). The NCO has a nucleotide sequence similar to aptamer 1.12.2, but the guanines were substituted by cytosines. The nomenclature is the following: B: Before incubation, FT: Flow-through, W: Wash fraction, E: Elution fraction.

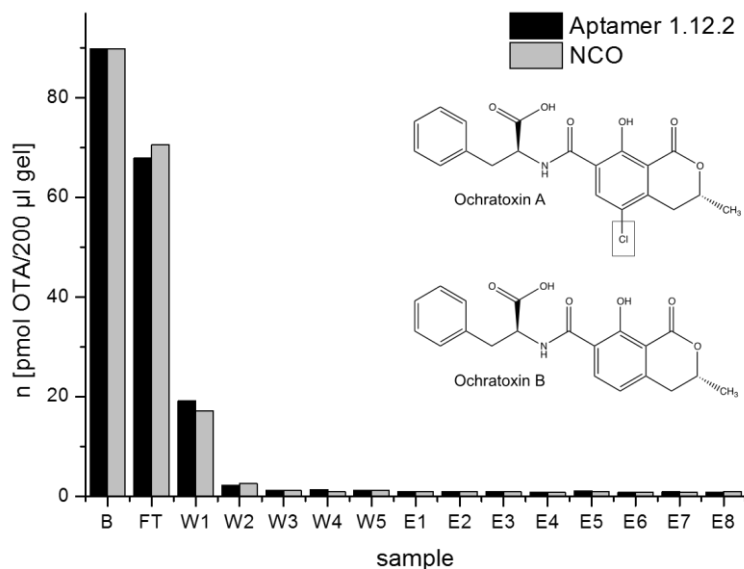


Fig. 6.4 Investigation of the binding behavior of aptamer 1.12.2 towards OTB. Again, the experiment was also performed using an oligonucleotide as a negative control (NCO). OTB differs from OTA only at the position C5, where the chloride is replaced by a hydrogen atom. The graph shows the amount of OTB in pmol/200 µl gel in the several fractions starting from the initial concentration 90 pmol OTB. The nomenclature is the following: B: Before incubation, TP: Throughput, W: Wash fraction, E: Elution fraction.

This is a certain prove of specific OTA binding to the aptamer 1.12.2. Fig. 6.3 shows the result of the experiments in a bar chart. In order to demonstrate the specificity of the aptamer towards OTA, we used the structural analogue ochratoxin B (OTB) as a control. OTB differs from OTA in its structure in only one position; in the position C5 the chloride atom is replaced by a hydrogen atom. The chemical structure of OTA and OTB are represented in the Fig. 6.4. The experiment was carried out as described before: for the coupling reaction 16 nmol aptamer/200 μ l gel was used. Also, NCO was used as a reference in this experiment. In both cases more than 89% of oligonucleotide was immobilized on the column. As shown in Fig. 6.4, OTB could be bound neither by the aptamer nor by the NCO. Most of the OTB was detected in the flow-through and in the washing steps W1 and W2. In the other washing and elution steps only ground noise of OTB (smaller than 1 pmol OTB) was detected. In conclusion, the aptamer 1.12.2 binds to OTA specifically and does not interact with the structural analog OTB. Furthermore, the binding of OTA is specific to the aptamer in comparison to random oligonucleotide.

6.1.4.5. Applicability to complex samples/real samples

In order to investigate if the aptamer is able to bind OTA in real samples, we used two different mediums spiked with OTA. On the one hand we diluted one part beer with one part binding buffer and on the other hand we used pure beer. The beer was degassed for 20 min in an ultrasonic bath. To compare the results in one graph (Fig. 6.5) the amount for OTA in each fraction is shown as the portion of the applied amount of OTA. The immobilization of aptamer was performed as before, 14.4 nmol aptamer were immobilized on 200 μ l gel and the columns were washed with binding buffer before the usage with spiked samples. In this way, we aimed to fold the aptamer into the correct 3D-structure to allow capture of the OTA in the unusual medium. For the sample composed of one part beer and one part binding buffer, the aptamer could bind 91.75% of the applied OTA (1 ml of 130 nM OTA (130 pmol)) successfully. In the elution steps 88.90% of bound OTA could be released. Afterwards we spiked one milliliter of pure degassed beer with 90 nM OTA and applied it on the aptamer column. In this case only 20.91% of the OTA could be captured by the aptamer and 100% of bound OTA could be released in the elution. This experiment shows that the aptamer at least partially remains functional in real samples, if the aptamer has been folded in binding buffer before.

Nonetheless, the reduced amount of OTA bound to the aptamer indicated a significant loss of functionality and a portion of the aptamer may be in an unfolded state under these

conditions. According to European Union regulations the weekly uptake of OTA for humans should not exceed 120 ng OTA per 1 kg body weight (regulation of commission No. 594/2012). The maximum allowed concentration of OTA in grain is 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and in grain related products, such as beer, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This means that the regulatory minimum level of OTA in one milliliter beer is 7.2 pmol. In our experiments we could deplete 85.57 pmol out of 91.10 pmol OTA (per milliliter binding buffer) with only 200 μl aptamer modified gel. The left amount of OTA in the buffer was 5.53 pmol, which is lower than the EU regulatory minimum level of OTA in one milliliter of beer. For the sample composed of 130 pmol OTA in 1 ml beer plus binding buffer, the depletion amount of OTA was 119.6 pmol, which implies that the remaining OTA in the sample (10.40 pmol) is also in the range of the allowed level of OTA.

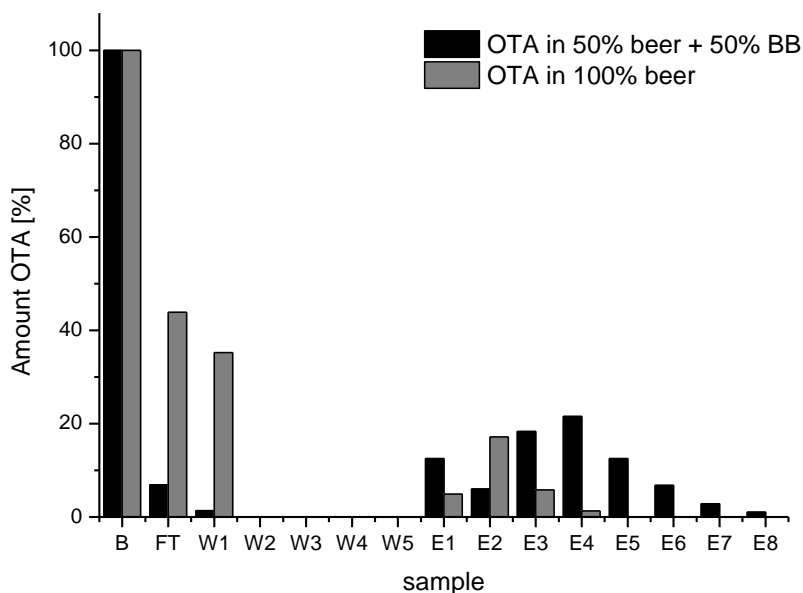


Fig. 6.5 Depletion of OTA from a complex sample using diluted (50% beer + 50% binding buffer) and undiluted beer. Amount of OTA in each sample is displayed in percentage at the y-axis. The nomenclature is the following: B: Before incubation, FT: Flow-through, W: Wash fraction, E: Elution fraction.

6.1.4.6. Determination of K_D values of the aptamer in complex samples

In order to further investigate the observed loss of aptamer activity in complex samples, we have performed a series of microscale thermophoresis (MST) experiments. MST is the movement of molecules along a temperature gradient and it depends on the charge, size and hydration shell of molecules and thus changes upon the binding between aptamer and target. Using this method we have determined the K_D values for aptamer 1.12.2 binding to OTA in different complex samples. It is an immobilization free method and just

one binding partner needs to be fluorescently labeled. Here, we labeled the aptamer with a Cy5-dye at the 5' end and used an aptamer concentration of 25 nM in all MST experiments. OTA was the ligand that was titrated and depending on the buffer component, we used different starting concentrations of OTA.

Fig. 6.6A shows the resulting binding curves obtained in different buffer compositions. The fraction of bound OTA is plotted on the y-axis. We fitted the curves using the K_D model by the NT.Analysis Software supplied by NanoTemper. Determined K_D values are summarized numeric in the Table 1. In the pure binding buffer, we ascertained a K_D value similar to the literature. The K_D determined through MST was 32.49 nM and in the literature, it is 50 nM determined by equilibrium dialysis [54]. With increasing the percentage of degassed beer in the mixture of binding buffer and beer, the dissociation constant increased exponential, from 32.49 nM to 209.78 μ M. Even 25% beer in the mixture has a huge effect on the K_D : it is 7.6 times higher than the K_D in pure binding buffer. Furthermore, we investigated the effect of 4 and 12% ethanol in the binding buffer according to the ethanol percentages of beer and wine. The K_D value increased from 32.49 nM to 126.20 nM and 287.37 nM, respectively (supplementary information, Fig. 9). This rise is relatively marginal compared to the K_D value increase observed in pure beer (209.78 μ M). Hence, we looked at the pH value in complex samples as another parameter, which differs in the binding buffer of the aptamer 1.12.2. The pH value in beer is acid (pH 4.5), while the pH value in the binding buffer is 8.5.

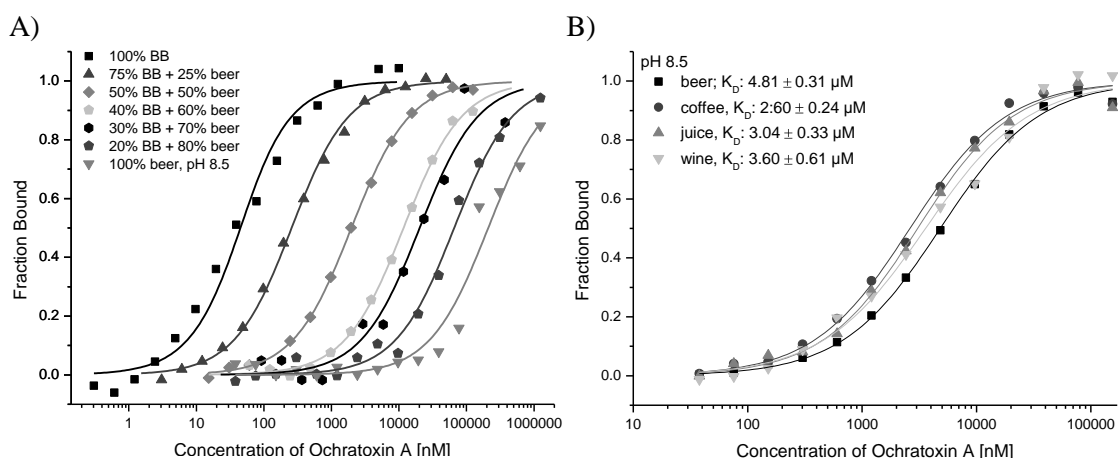


Fig. 6.6 Aptamer 1.12.2 binding to OTA in different complex samples and the resulting K_D values. Binding curves were generated by the NT.Analysis Software, and edited by Origin. The aptamer concentration was kept constant at 25 nM, while the concentration of OTA varied from A) 0.3 nM to 1.24 mM (x-axis) and B) 37 nM to 155 μ M. On the y-axis the fraction of bound aptamers is plotted normalized. The curves are fitted using the K_D model in the NT.Analysis Software.

In order to determine the influence of pH and K_D , we adjusted the pH values of beer to 8.5. This results in a decrease of K_D to 4.81 μM . To further investigate the applicability of aptamer 1.12.2 to real samples, we also used wine, coffee and apple juice in MST experiments. Based on the found pH dependency of the K_D , all samples were adjusted to pH 8.5. We found that the composition of the complex sample has no significant effect (K_D : 2.60–4.81 μM). The K_D values of the real samples with pH 8.5 were in the low instead of high micromolar range like the pure beer with a pH of 4.5 (Fig. 6.6B, Table 1). This experiment demonstrates that the pH value of complex samples has a significant effect on the aptamer affinity.

The observed loss of aptamer binding activity in complex samples represents the current limitation of the use of aptamers in depletion processes from complex samples. To overcome this limitation it would be possible to generate aptamers that are functional in the respective medium (*e.g.* beer) by using this medium in the selection procedure. This would allow designing customized aptamers especially applicable for depletion from the respective media.

Table 6.2 K_D and K_D confidence values [nM] for different buffer conditions: increasing the amount of beer in the mixture of binding buffer and beer, and different pH values.		
Buffer conditions	K_D [nM]	K_D Confidence [nM]
100% BB	32.49	7.05
75% BB + 25% beer	245.10	14.85
50% BB + 50% beer	1964.40	64.81
40% BB + 60% beer	11681.68	804.75
30% BB + 70% beer	20273.10	5835.53
20% BB + 80% beer	65799.69	7999.22
100% beer, pH 4.5	209779.48	55603.56
100% beer, pH 8.5	4808.35	309.36

6.1.5. Conclusion

In this work, we investigated the applicability of aptamers for the depletion of small molecules using OTA as a model system. The protocol was optimized with regard to time and cost in order to establish a more economical process. We have shown that aptamer 1.12.2 is able to bind OTA specifically. Neither can a different oligonucleotide does bind OTA, nor can aptamer 1.12.2 bind OTB, a very similar molecule which differs from OTA

only in one position. Furthermore, aptamer 1.12.2 was shown to be at least partially functional in real samples. The immobilization material CarboxylLink™ Coupling Gel does not interact with OTA nonspecifically, as shown by confocal microscopy. Nonetheless, the use of this porous material resulted in diffusion limitations, thus either prolonged times for OTA binding (6 h) are needed, or the incomplete utilization of the bead volume has to be accepted. The goal of this work was to investigate the applicability of aptamers as ligands for the depletion of small molecules from real samples. While providing high specificity and depletion efficiencies, a current limitation of the developed process is the fact that the aptamers loses binding activity in the absence of the selection buffer. For the aptamer 1.12.2 we found a significant dependency of K_D on the pH value of the sample. We demonstrated this in binding and depletion studies and further confirmed it in MST experiments. The values of the dissociation constants varied from 32.5 nM in binding buffer to 210 μ M in pure beer. To overcome this limitation, the selection of aptamers in complex medium is suggested.

Acknowledgements

Parts of this study were funded by grants from the German Research Foundation (DFG) to the REBIRTH Cluster of Excellence (EXC 62/2) and by Europäische Fonds für regionale Entwicklung (EFRE). We thank Professor Birgit Glasmacher and Lutz Dreyer, Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover for their support with the confocal microscopy. Furthermore, we want to thank Dr. Astrid Sitte (NanoTemper Technology GmbH, Munich) for helpful discussion of the MST experiments.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei verschiedene biologische Erkennungssysteme für organische *small molecules* hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit in biotechnologischen Anwendungen untersucht. Es wurden Hitzeschockproteine (HSPs) zur Wirkstoffsondierung und Aptamere zur Abreicherung von Pilzgift-Kontaminationen eingesetzt.

Entwicklung und Anwendung eines Protein-Microarrays für das Screening von potentiellen HSP-Inhibitoren

Es wurde ein miniaturisierter direkt-kompetitiver Protein-Microarray entwickelt, mit dem eine parallele und schnelle Durchführung der Wirkstoffsondierung möglich ist. Auf einem Microarray können mehrere Proteine nebeneinander immobilisiert und bis zu 16 verschiedene potentielle Inhibitoren gleichzeitig getestet werden. Aufgrund der geringen Proteinmenge, 50 ng/pro Microarray, ist dieses Screening Verfahren eine kostengünstige Methode im Vergleich zu anderen Screening Verfahren, die derzeit im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt werden.

Es wurde ein bakterielles, ein pflanzliches, und ein humanes HSP, sowie Krebszelllysate auf der Nitrocellulosemembran der Microarrays über nicht-kovalente hydrophobe Wechselwirkungen in verschiedenen Versuchsreihen immobilisiert. Es wurde ein kontaktfreier Spotter verwendet, sodass die Membran nicht beschädigt wurde. Anschließend wird ein Fluoreszenz-markiertes ATP (Cy3-ATP) gleichzeitig mit einem potentiellen *small molecule* Inhibitor auf den Microarray inkubiert und die beiden Moleküle konkurrieren um die ATP-Bindedomäne der HSPs. Anhand der anschließenden Fluoreszenzsignalmessung kann die Bindungseigenschaft des Inhibitor bestimmt werden. Ein *small molecule* mit einer höheren Affinität zur ATP-Bindetasche als das Cy3-ATP löst ein schwächeres Fluoreszenzsignal aus als das reine Cy3-ATP.

Es konnten neben bereits bekannten HSP-Inhibitoren, wie 17-AAG und Radicol, neue Geldanamycin- und Reblastin-Derivate getestet werden. Für die Versuche wurde gereinigtes humanes HSP90 α , bakterielles HtpG aus *H. pylori* und pflanzliches HSP83 aus *A. thaliana* verwendet. Einige *small molecules* wiesen einen inhibitorischen Effekt auf und die ermittelten IC₅₀-Werte lagen für die HSPs im nanomolaren Bereich (0,5 nM – 210 nM). Ein besonderes Ergebnis lieferte der Wirkstoffkandidat 17-AAG, er bindet mit einem IC₅₀-Wert von 51 nM an das humane HSP90 α , nicht aber an das HtpG, obwohl

sich beide Proteine in ihrer Aminosäuresequenz in der Bindedomäne nur marginal unterscheiden. Das Ziel ist es, in der Zukunft noch weitere selektive Inhibitoren zu finden, sodass eine spezifische Medikation möglich ist. Des Weiteren wurde der Protein-Microarray auf seine Lagerstabilität hin untersucht. Er ließ sich ohne Verlust der Protein-stabilität über einen Monat bei 4°C lagern. Anschließende Verdrängungsversuche mit einem Geldanamycin-Derivat waren möglich.

Der entwickelte Protein-Microarray wurde auf weitere Anwendungen übertragen. Wie zuvor erwähnt wurde ein Krebszelllysate auf den Mikroarray aufgebracht. HSPs werden in Krebszellen vermehrt produziert. Es könnte mit dem Protein-Microarrays in Zukunft unter Verwendung von patienteneigener Proben an den jeweiligen Patienten angepasste Inhibitoren gefunden werden oder erhöhte HSP-Titer in verdächtigen kranken Geweben bzw. Flüssigkeiten festgestellt werden. In einem Vorversuch konnte eine Verdrängung des Cy3-ATP durch ein fluoriniertes Reblastin-Derivat bei Lungenkrebszelllysaten gezeigt werden.

Bisher wurde die ATP-Bindungsstasche der HSPs als mögliche Target-Bindestelle benutzt. Doch besitzen HSPs noch weitere aktive Bindungsstellen wie die Klienten-Bindedomäne. Die Klientenproteine binden HSPs, wenn sie nicht falsch gefaltet vorliegen. Es wurden drei verschiedene Fluoreszenz-markierte Volllängenproteine (Luciferase, Calmodulin, KcsA) in ihrer denaturierten und nativen Form auf die Bindung an humanes HSP90 α untersucht. Es konnte mit Hilfe der Luciferase und des Kaliumkanals KcsA gezeigt werden, dass die Bindungsdomäne des immobilisierten HSPs aktiv ist und dies eine weitere mögliche Target-Bindestelle für Wirkstoffe ist.

Der Protein-Microarray ist außerdem potentiell auf andere diverse ATP-bindende Proteine übertragbar und eine Automatisierung durch eine Waschstation und einen Pipettierroboter wäre möglich, sodass Microarrays im Hochdurchsatz-Screening dabei helfen könnten, neue Wirkstoffe zu identifizieren.

Aptamer-basierte Abreicherungen und Bindungsuntersuchungen von einem toxischen *small molecule*

Für die Aptamer-basierte Abreicherung und die Bindungsuntersuchungen wurde als Modelaptamer das in der Literatur gut beschriebene Aptamer 1.12.2 gegen Ochratoxin A (OTA) verwendet. OTA ist ein Mykotoxin der Pilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* und kommt häufig in Getreide oder Getreide verarbeiteten Produkten wie Brot und Bier vor. Eine Kontamination kann während des Anbaus, der Ernte, der Lagerung oder der

Verarbeitung der Pflanzen stattfinden. Um eine Abreicherung des OTAs im Säulenformat zu entwickeln, wurde das Aptamer erfolgreich auf ein CarboxylLink Gel über das 5'-Phosphatende immobilisiert. Es konnten 92,5% des angetragenen Aptamers von der Säule gebunden werden (14,81 nmol/200 µl Gel). Anschließend wurden verschiedene Versuche mit dem Bindungspuffer und mit komplexen Proben durchgeführt.

Zuerst wurde OTA in Bindungspuffer auf die Aptamer-modifizierte Säule gegeben und es konnte 90% des aufgetragenen OTAs gebunden werden. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit Bindungspuffer konnte OTA mit einem EDTA-haltigen Puffer eluiert werden. 76,5% des gebundenen OTAs wurde in den Elutionsfraktionen wieder gefunden. Die Säule konnte innerhalb von 20 Tagen ohne Verminderung des Aptameraffinität vier Mal wieder verwendet werden.

Eine Optimierung der Versuchsdurchführung erfolgte mit Hilfe von konvokalmikroskopischen Aufnahmen. Das Aptamer wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und wie zuvor auf dem porösen Gelmaterial immobilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer kurzen Inkubationszeit, das OTA nicht an die Aptamer im Inneren des Gelpartikels binden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den weiteren Versuchen eine geringe Stoffmenge an Aptameren für die Immobilisierung eingesetzt, da die Aptamere auf der Säule auch nur eine kurze Inkubationszeit mit dem OTA haben. Außerdem wurde das Verfahren dadurch wirtschaftlicher.

Die Spezifität und die Sensitivität des Aptamers gegenüber OTA wurden in zwei verschiedenen Versuchsreihen getestet. Zum einen wurde das OTA durch Ochratoxin B (OTB) und zum anderen das Aptamer gegen ein ähnliches einzelsträngiges Oligonukleotid ersetzt. Das Oligonukleotid hat bis auf die Guanin Nukleotide die gleiche Struktur wie das Aptamer, die Guanine wurden durch Cytosine ersetzt. In dem Abreicherungsversuch mit dem Negativkontroll-Oligonukleotid konnte keine Bindung von OTA an die Säule detektiert werden. Das Mykotoxin wurde in dem Durchlauf und den Waschfraktionen wieder gefunden. Dies bestätigt, dass OTA spezifisch an das Aptamer bindet. Anschließend wurde OTB, das sich von OTA nur an der Position C5 unterscheidet, auf eine Aptamer-modifizierte Säule gegeben. Das OTB wurde nicht von den Aptameren gebunden. Das Aptamer 1.12.2 hat somit eine hohe Spezifität gegenüber OTA.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten des Aptamer in komplexen Proben in Abreicherungs- und Microscale Thermophoresis (MST) Versuchen analysiert. Zuerst wurden Bierproben mit zugesetztem OTA als komplexes Medium auf die Aptamer-Säule gegeben. Es erfolgte eine schwache Bindung von OTA durch die Aptamere,

wenn reines entgastes Bier als Medium benutzt wurde. Es konnten nur 21% des auftragenden OTAs an die Säule gebunden werden. Wenn ein Teil Bier und ein Teil Bindungspuffer als komplexes Medium benutzt wurden, ließen sich 92% des aufgegebenen OTAs an die Aptamer-modifizierte Säule binden.

Weitere Untersuchungen zum Bindungsverhalten des Aptamers 1.12.2 in komplexen Medien wurden mit der MST durchgeführt. Mit Hilfe der MST konnten die Dissoziationskonstanten in verschiedenen Matrices (Bindungspuffer, Bier, Kaffee, Wein, Saft) ermittelt werden. Im Bindungspuffer konnte eine K_D von 32,49 nM bestimmt werden, die ähnlich zu der in der Literatur beschriebenen K_D ist (50 nM). Mit einem erhöhten Prozentsatz an entgastem Bier in einer Mischung aus Bier und Bindungspuffer erhöhte sich die K_D exponentiell auf 210 μ M im reinen Bier. Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um die verringerte Affinität des Aptamers in realen Proben zu erklären.

Dafür wurde zunächst der Einfluss von Ethanol auf die Dissoziationskonstante untersucht. Der Bindungspuffer wurde mit 4% und 12% Ethanol versetzt und die Dissoziationskonstante des Aptamers 1.12.2 zu OTA wurde in diesem Gemisch ermittelt. Es kam zu einem Anstieg der K_D um einen Faktor von 8 im Vergleich zur K_D im Bindungspuffer. Doch ist dieser Unterschied vernachlässigbar im Vergleich zum K_D Anstieg von Faktor 6400 im reinen Bier.

Ein weiterer Parameter der das Bier vom Bindungspuffer unterscheidet ist der pH-Wert. Bier hat einen pH-Wert von 4,5 während der Bindungspuffer einen pH-Wert von 8,5 besitzt. Es wurde eine MST-Messung mit Bier, dessen pH-Wert auf 8,5 eingestellt wurde, durchgeführt und eine K_D von 4,81 μ M ermittelt. Dieses Ergebnis lässt auf einen großen pH-Wert Einfluss für die Bindung von OTA an das Aptamer schließen. Auch in anderen komplexen Proben (Wein, Saft, Kaffee) mit pH-Wert 8,5 ließen sich ähnliche K_D -Werte ermitteln. Die Zusammensetzung der komplexen Proben hat im Vergleich zum pH-Wert keinen signifikanten Einfluss auf die Dissoziationskonstante.

Es konnte gezeigt werden, dass Aptamere hoch selektive und sensitive biologische Erkennungsmoleküle für *small molecules* sein können, solange das Medium dem Selektionspuffer entspricht. Abweichungen vom Selektionspuffer führen zu einer drastischen Verschlechterung der Bindungseigenschaften des Aptamers und des Zielmoleküls. Für weitere Aptamer-Selektionsprozesse sollte darauf geachtet werden, dass die Selektionsbedingungen nah an die späteren Anwendungen angelehnt werden und somit das Aptamer auch noch in realen Anwendungen als hoch affines Detektionsmolekül dienen kann.

Proteine und Aptamer verhalten sich als biologische Erkennungssysteme hinsichtlich ihrer Spezifität und ihrem Bindungsmechanismus von *small molecules* sehr ähnlich. Bereits kleine Veränderungen in der Struktur des Liganden oder des Rezeptors führen dazu, dass eine schlechte bzw. keine Bindung stattfindet. Zur Analyse der Rezeptor-Ligand-Bindung wurden gleichartige Methoden verwendet, einerseits die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) und andererseits die Dissoziationskonstante (K_D).

Supplemental Material

Supplementary data to section 4.2

Z-factor for validation high-throughput screening

The Z-factor reported by Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1999) is a dimensionless parameter with values between $-\infty < Z < 1$, that depends on positive and negative controls. The quality of an assay is ideal, if the Z-factor has the value of 1. When the value is between 0.5 and 1 the assay is very reliable, while a value between 0 and 0.5 represents a poor assay that is difficult to reproduce.

Purification of thiophene-substituted reblastatin derivatives

Isolation of reblastatin derivatives was achieved by preparative high performance liquid chromatography using a MERCK HITACHI LaChrom system (pump L-7100, diode array detector L-7450 ($\lambda = 220\text{--}400$ nm, preferred monitoring at $\lambda = 248$ nm)) with columns (abbreviations referred to in the experimental part): TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , 250 mm * 25 mm, with guard column, 30 mm * 20 mm; TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , 250 mm * 8 mm, with guard column, 40 mm * 8 mm; TRENTEC Reprisil 100 CN 5 μm , 250 mm * 8 mm, with guard column, 40 mm * 8 mm. Operating conditions and retention times (rt) are reported in the experimental part. Commercially available reagents, chromatography type or dry solvents were used as received or purified by standard techniques according to the literature.

For 28 and 30: 1st Purification: TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm ; gradient H₂O/CH₃CN 95/5 \rightarrow 70/30 over 40 min, then 70/30 \rightarrow 65/35 over 10 min, then 65/35 \rightarrow 45/55 over 20 min, then 45/55 \rightarrow 35/65 over 15 min, then 100% CH₃CN over 10 min; flow rate 2.5 mL/min); 2nd purification: CN phase; gradient H₂O/CH₃CN 95/5 \rightarrow 70/30 over 40 min, then 70/30 \rightarrow 65/35 over 10 min, 65/35 \rightarrow 45/55 over 20 min, then 45/55 \rightarrow 35/65 over 15 min, then 100% CH₃CN over 10 min; flow rate 2.5 ml/min). 17-Desmethoxy-18-thiophenyl-reblastatin (0.5 mg, 0.8 μmol ; 62%) (1st purification: t_R= 84.29 min and 2nd purification: t_R= 56.77 min) and 17-desmethoxy-18-thiophenyl-7-hydroxy-reblastatin (0.2 mg, 0.4 μmol ; 30%) (1st purification: t_R=83.84 min and 2nd purification: t_R= 51.55 min) are isolated as white foams.

For 29 and 31: TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm ; gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 \rightarrow 75/25 over 40 min, then 75/25 \rightarrow 70/30 over 20 min, then 70/30 \rightarrow 60/40 over 10 min, then 60/40 \rightarrow 50/50 over 15 min, then 100% CH_3CN over 10 min; flow rate 2.5 mL/min. 17-Des-O-methyl-18-thiophenyl-reblastatin (0.3 mg, 0.5 μmol ; 25%) 29 (tR= 56.96 min) and traces of 17-des-O-methyl-18-thiophenyl-7-hydroxyreblastatin 31 (tR= 64.15 min) are isolated as colorless foams.

Analysis of potential inhibitors

^1H -NMR spectra were measured at 400 MHz with a BRUKER Avance-400 or at 500 MHz with a BRUKER DRX-500 at room temperature. Multiplicities are described using the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. ^{13}C -NMR spectra were measured at 100 MHz with a BRUKER Avance-400 and at 125 MHz with a BRUKER DRX-500. Multiplicities are reported using the following abbreviations: s = singlet (due to quaternary carbon), d = doublet (methine), t = triplet (methylene), q = quartet (methyl). Chemical shift values of ^1H and ^{13}C -NMR spectra are commonly reported as values in ppm relative to residual solvent signal as internal standard. For interpretation of ansamitocin and geldanamycin derivative spectra, supporting 1H-1H correlation (COSY) and ^1H - ^{13}C correlation (phase-sensitive HSQC, HMBC) experiments were performed. Mass spectra were obtained with a type Q-TOF premier (MICROMASS) spectrometer (ESI mode) in combination with a WATERS Acquity S2 UPLC system equipped with a WATERS Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (SN 01473711315545) column. Retention times (tR) are given in the experimental part. Ion mass signals (m/z) are reported as values in atomic mass units. Analytical thin-layer chromatography was performed using precoated silica gel 60 F254 plates (MERCK) and the spots were visualized with UV light at 254 nm or alternatively by staining with ninhydrin, permanganate or 4-methoxybenzaldehyde solutions. Isolation of reblastatin derivatives was achieved by preparative high performance liquid chromatography using a MERCK HITACHI LaChrom system (pump L-7100, diode array detector L-7450 ($\lambda = 220\text{--}400$ nm, preferred monitoring at $\lambda = 248$ nm)) with columns (abbreviations referred to in the experimental part): TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , 250 mm * 25 mm, with guard column, 30 mm * 20 mm; TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , 250 mm * 8 mm, with guard column, 40 mm * 8 mm; TRENTEC Reprosil 100 CN 5 μm , 250 mm * 8 mm, with guard column, 40 mm * 8 mm. Operating conditions and retention times

(rt) are reported in the experimental part. Commercially available reagents, chromatography type or dry solvents were used as received or purified by standard techniques according to the literature.

28: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.68 (dd, $J = 2.7, 1.3$ Hz, 1H, thiophene 22-H), 7.50 (dd, $J = 5.0, 2.7$ Hz, 1H, thiophene 24-H), 7.49 (dd, $J = 5.0, 1.3$ Hz, 1H, thiophene 25-H), 7.35 (br s, 1H, 19-H), 7.26 (s, 1H, 17-H), 6.70 (s, 1H, 21-H), 5.71 (br s, 1H, 3-H), 5.16 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 9-H), 5.84 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, 7-H), 3.61 (dd, $J = 9.8, 1.9$ Hz, 1H, 11-H), 3.41 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.31-3.26 (m, 1H, 6-H), 3.07-3.05 (m, 1H, 12-H), 2.80 (dd, $J = 12.5, 2.2$ Hz, 1H, 15- H_a), 2.62 (dd, $J = 12.5, 4.8$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.33-2.24 (m, 2H, 10-H, 4- H_a), 2.15-2.04 (m, 2H, 14-H, 4- H_b), 1.88 (s, 3H, 2-Me), 1.72 (ddd, $J = 13.0, 10.3, 3.5$ Hz, 1H, 13- H_a), 1.29 (s, 3H, 8-Me), 1.15-1.09 (m, 1H, 5- H_a), 1.06-1.0 (m, 1H, 5- H_b), 0.99 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 10-Me), 0.94-0.87 (m, 1H, 13- H_b), 0.77 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H, 14-Me) ppm; $^{13}\text{CNMR}$ (125 MHz, methanol- d_4 , methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 159.0 (s, -OC(O)NH₂), 137.6 (s, C-23), 135.9 (s, C-3), 134.1 (d, C-9), 132.2 (s, C-2), 127.4 (d, C-25), 127.1 (d, C-24), 124.9 (d, C-atom.), 124.4 (d, C-atom), 121.7 (d, C-22), 118.9 (d, C-atom.), 81.4 (d, C-7), 81.2 (d, C-12), 80.5 (d, C-6), 73.5 (d, C-11), 59.9 (q, C-12 OMe), 58.4 (q, C-6 OMe), 43.8 (t, C-15), 36.1 (d, C-10), 31.1 (t, C-13), 29.9 (d, C-5), 28.6 (t, C-14), 24.2 (t, C-4), 14.0 (q, C2 Me), 11.9 (q, C-8 Me) ppm; lack of material hampered unequivocal detection of C-1, C-8, C-10-Me, C-14-Me, C-16, C-18, C-20 in the ^{13}C NMR spectrum; UPLC-MS rt = 2.45 min; HRMS [ESI] m/z for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ [M+Na]: calc. 607.2818, found 607.2808.

29: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, THF- d_8 , THF- $d_7 = 1.73$ ppm): δ 8.16 (dd, $J = 3.0, 1.1$ Hz, 1H, 22-H), 7.51 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1H, 25-H), 7.43 (dd, $J = 5.1, 3.0$ Hz, 1H, 24-H), 7.29 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 19-H), 6.64 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 21-H), 6.24 (dd, $J = 7.0, 6.2$, 1H, 3-H), 5.51 (br s, 2H, NH₂), 5.35 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, 9-H), 4.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 7-H), 3.40 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (ddd, $J = 8.2, 4.3, 3.2$ Hz, 11-H), 3.32 (ddd, $J = 8.4, 3.7, 2.6$ Hz, 1H, 6-H), 3.29 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, 7-OH), 3.26 (s, 3H, 6-OMe), 3.04 (ddd, $J = 8.2, 4.7, 3.5$ Hz, 1H, 12-H), 2.45-2.39 (m, 1H, 15- H_a), 2.45- 2.39 (m, 2H, 10-H, 4- H_a), 2.28-2.20 (m, 2H, 15- H_b , 4- H_b), 1.90-1.88 (m, 1H, 14-H), 1.53 (ddd, 1H, $J = 14.1, 9.0, 4.7$ Hz, 1H, 13 H_a), 1.46 (s, 3H, 8-Me), 1.43-1.36 (m, 2H, 5-H), 1.30 (s, 3H, 2-Me), 1.21-1.13 (m, 1H, 13- H_b), 0.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 10-Me), 0.93 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, 14-Me) ppm; UPLC MS rt = 2.27 min; HRMS [ESI] m/z for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{NaS}$ [M+Na]: calc. 623.2767, found

623.2783. 31: UPLC-MS rt = 2.31 min; HRMS [ESI] m/z for $C_{31}H_{43}NO_6NaS$ [M+Na]: calc. 580.2709, found 580.2725.

30: 1H -NMR (500 MHz, THF- d_8 , THF- d_7 , = 1.37 ppm): δ 8.53 (s, 1H, NH), 7.56 (br s, 1H, H atom.), 7.55 (dd, J= 1.8, 1.8 Hz, 1H, 22-H), 7.42 (dd, J= 5.0, 1.8 Hz, 1H, 24-H), 7.41 (dd, J= 5.0, 1.8 Hz, 1H, 25-H), 7.14 (s, 1H, H-atom.), 6.78 (s, 1H, H-atom.), 5.93 (dd, J= 6.4, 6.2 Hz, 1H), 5.20 (d, J= 8.1 Hz, 1H, 9-H), 3.76 (dd, J= 6.8, 4.1 Hz, 1H, 7-H), 3.49 (ddd, J= 11.2, 4.3, 2.6 Hz, 1H, 11-H), 3.42 (s, 3H, 12-OMe), 3.33 (s, 3H, 6-OMe), 3.27 (d, J= 4.3 Hz, 1H, 7-OH), 3.15-3.10 (m, 2H, 6-H, 12-H), 2.70 (dd, J= 13.2, 5.9 Hz, 1H, 15-H_a), 2.57 (dd, J= 13.2, 5.9 Hz, 1H, 15-H_b), 2.50 (ddq, J= 8.1, 6.9, 2.6 Hz, 1H, 10-H), 2.27-2.24 (br m, 1H, 4-H_a), 2.15-2.09 (br m, 1H, 4-H_b), 2.07-2.02 (m, 1H, 14-H), 1.82 (s, 3H, 2-Me), 1.66 (m, 1H, 13-H_a), 1.37 (s, 3H, 8-Me), 1.35-1.32 (m, 2H, 5-H), 1.22 (ddd, J= 13.7, 8.5, 3.6 Hz, 1H, 13-H_b), 0.97 (d, J= 6.9 Hz, 3H, 10-Me), 0.90 (d, J= 6.6 Hz, 3H, 14-Me) ppm; UPLC-MS rt = 2.50 min; HRMS [ESI] m/z for $C_{31}H_{43}NO_5NaS$ [M+Na]: calc. 564.2760, found 564.2754.

Supplementary data to section 6.2

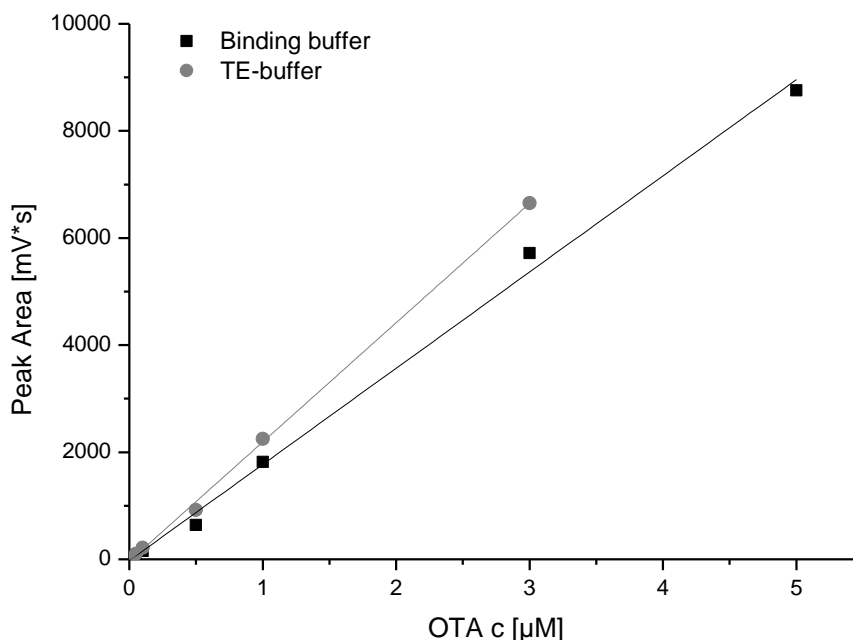


Fig. 6.7 Calibration plot for OTA in the 0.05 to 5 μ M concentration range. The equation for OTA in the binding buffer is $y = 1804.1 x$ and $R^2 = 0.9976$ and for OTA in TE-buffer is $y = 2210.9 x$ and $R^2 = 0.9988$.

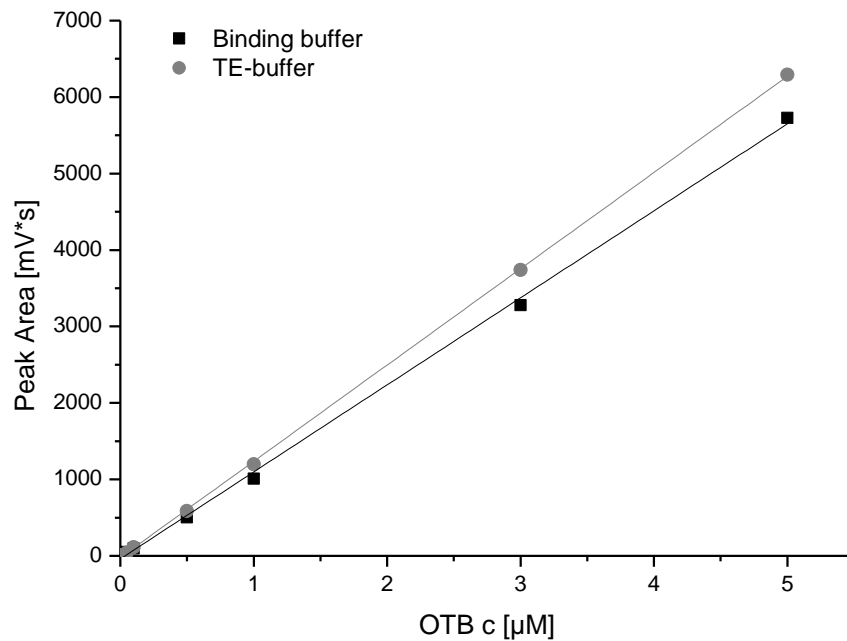


Fig. 6.8 Calibration plot for OTB in the 0.005 to 5 μM concentration range. The equation for OTB in the binding buffer is $y = 1127.2 x$ and $R^2 = 0.9987$ and for OTB in TE-buffer is $y = 1253.0 x$ and $R^2 = 0.9998$.

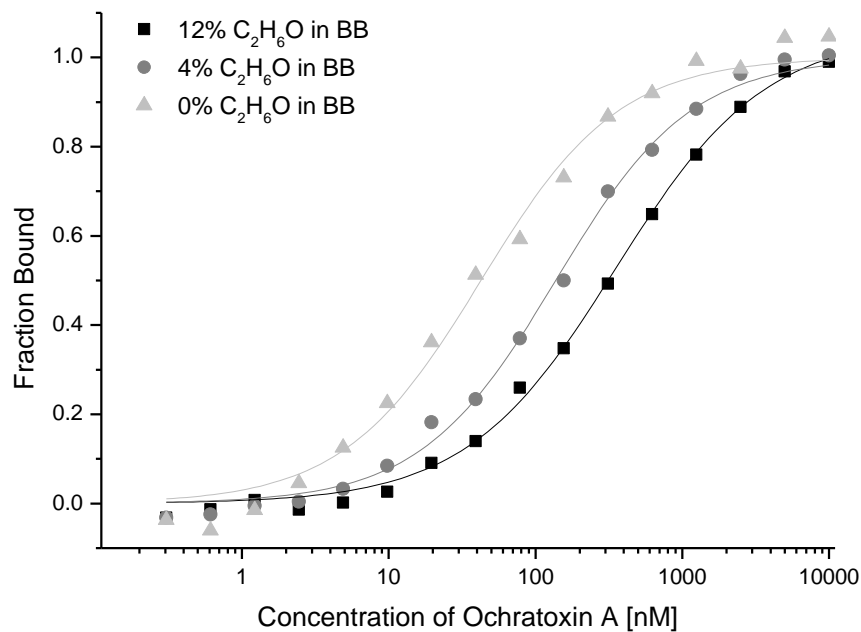


Fig. 6.9 Aptamer 1.12.2 binding to OTA in binding buffer spiked with ethanol (4% and 12%) and the resulting K_D values (32.49, 126.20 and 287.37 nM). The binding curves were generated by the NT.Analysis Software, and edited by Origin. The aptamer concentration was kept constant at 25 nM , while the concentration of OTA varied from 0.3 nM to 10 μM (x-axis). On the y-axis the fraction of bound aptamers is plotted normalized. The curves are fitted using the K_D model in the NT.Analysis Software.

Literatur

1. McKeague, M. and M.C. Derosa, *Challenges and opportunities for small molecule aptamer development*. J Nucleic Acids, 2012: p. 20.
2. Clark, D., *Molecular Biology*. Vol. 1. 2006: Spektrum Akademischer Verlag.
3. Ganellin, R., S. Roberts, and R. Jefferis, *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*. 2013: Elsevier.
4. Ji, T.H., M. Grossmann, and I. Ji, *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. J Biol Chem, 1998. 273(28): p. 17299-302.
5. Schettler, G., et al., *Betablocker und Lipidstoffwechsel*. 1984: Springer.
6. Richter, K., M. Haslbeck, and J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death*. Mol Cell, 2010. 40(2): p. 253-66.
7. Chen, B., D.B. Zhong, and A. Monteiro, *Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms*. BMC Genomics, 2006. 7(156).
8. Javid, B., P.A. MacAry, and P.J. Lehner, *Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity*. J Immunol, 2007. 179(4): p. 2035-40.
9. Schax, E., *Protein-Microarrays für die Wirkstoffentwicklung*. BestMasters 2015: Springer.
10. Taipale, M., D.F. Jarosz, and S. Lindquist, *HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. 11(7): p. 515-528.
11. Marcu, M.G., et al., *The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone*. J Biol Chem, 2000. 275(47): p. 37181-6.
12. Franke, J., et al., *Targeting heat-shock-protein 90 (Hsp90) by natural products: geldanamycin, a show case in cancer therapy*. Nat Prod Rep, 2013. 30(10): p. 1299-323.
13. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. 475(7356): p. 324-32.
14. Hahn, J.S., *The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development*. BMB Rep, 2009. 42(10): p. 623-30.
15. Zapf, C.W., et al., *Design and SAR of macrocyclic Hsp90 inhibitors with increased metabolic stability and potent cell-proliferation activity*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(8): p. 2278-82.
16. Li, Y., et al., *New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential*. Drug Resist Updat, 2009. 12(1-2): p. 17-27.
17. Trendowski, M., *PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction*. Pharmacol Res, 2015. 99: p. 202-16.
18. Moulick, K., et al., *Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90*. Nat Chem Biol, 2011. 7(11): p. 818-26.

19. Brandt, G.E., et al., *Gedunin, a novel hsp90 inhibitor: semisynthesis of derivatives and preliminary structure-activity relationships*. J Med Chem, 2008. 51(20): p. 6495-502.
20. Eichner, S., et al., *Broad Substrate Specificity of the Amide Synthase in S. hygroscopicus-New 20-Membered Macrolactones Derived from Geldanamycin*. Journal of the American Chemical Society, 2012. 134(3): p. 1673-1679.
21. Galam, L., et al., *High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase*. Bioorg Med Chem, 2007. 15(5): p. 1939-46.
22. Jung, G.n., *Combinatorial chemistry : synthesis, analysis, screening*. 1999, Weinheim ; Cambridge: Wiley-VCH. xxxii, 601 p.
23. Reinard, T., *Molekularbiologische Methoden*. Vol. 1. 2010: Eugen Ulmer KG.
24. Chipinda, I., J.M. Hettick, and P.D. Siegel, *Haptenation: chemical reactivity and protein binding*. J Allergy (Cairo), 2011. 2011: p. 839682.
25. Kalish, R.S., J.A. Wood, and A. LaPorte, *Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells in vitro*. J Clin Invest, 1994. 93(5): p. 2039-47.
26. Singh, K.V., et al., *Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules*. Bioconjug Chem, 2004. 15(1): p. 168-73.
27. Brichta, J., M. Hnilova, and T. Viskovic, *Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology: a review*. Vet. Med. – Czech 2005. 50(6): p. 231-252.
28. Thiviyanathan, V. and D.G. Gorenstein, *Aptamers and the next generation of diagnostic reagents*. Proteomics Clin Appl, 2012. 6(11-12): p. 563-73.
29. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. 346(6287): p. 818-22.
30. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. 249(4968): p. 505-10.
31. Klussmann, S., et al., *The Aptamer Handbook, Chapter 4. Aptamers to Small Molecules*. 2006, 6 Jun 2006: Wiley
32. Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. Biomol Eng, 2007. 24(4): p. 381-403.
33. Kim, Y.S. and M.B. Gu, *Advances in aptamer screening and small molecule aptasensors*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2014. 140: p. 29-67.
34. Kang, K.N. and Y.S. Lee, *RNA aptamers: a review of recent trends and applications*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. 131: p. 153-69.
35. Wochner, A., M. Menger, and M. Rimmel, *Characterisation of aptamers for therapeutic studies*. Expert Opin Drug Discov, 2007. 2(9): p. 1205-24.
36. Famulok, M., *Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules*. Curr Opin Struct Biol, 1999. 9(3): p. 324-9.

37. Carothers, J.M., et al., *Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity*. Nucleic Acids Res, 2010. 38(8): p. 2736-47.
38. Mann, D., et al., *In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 338(4): p. 1928-34.
39. Wochner, A., et al., *A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines*. Anal Biochem, 2008. 373(1): p. 34-42.
40. Niazi, J.H., S.J. Lee, and M.B. Gu, *Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines*. Bioorg Med Chem, 2008. 16(15): p. 7245-53.
41. Jo, M., et al., *Development of single-stranded DNA aptamers for specific Bisphenol a detection*. Oligonucleotides, 2011. 21(2): p. 85-91.
42. Williams, R.M., et al., *In vitro selection of a single-stranded DNA molecular recognition element against atrazine*. Int J Mol Sci, 2014. 15(8): p. 14332-47.
43. Wang, Y. and R.R. Rando, *Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA*. Chem Biol, 1995. 2(5): p. 281-90.
44. Geiger, A., et al., *RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity*. Nucleic Acids Res, 1996. 24(6): p. 1029-36.
45. Cox, J.C., P. Rudolph, and A.D. Ellington, *Automated RNA selection*. Biotechnol Prog, 1998. 14(6): p. 845-50.
46. Bala, J., et al., *In vitro selected RNA aptamer recognizing glutathione induces ROS mediated apoptosis in the human breast cancer cell line MCF 7*. RNA Biol, 2011. 8(1): p. 101-11.
47. Jeong, S., et al., *In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 281(1): p. 237-43.
48. Walter, J.-G., et al., *Aptasensors for Small Molecule Detection*. Z. Naturforsch. , 2012. 67b: p. 976–986.
49. Jenison, R.D., et al., *High-resolution molecular discrimination by RNA*. Science, 1994. 263(5152): p. 1425-9.
50. Huizenga, D.E. and J.W. Szostak, *A DNA aptamer that binds adenosine and ATP*. Biochemistry, 1995. 34(2): p. 656-65.
51. Entzian, C. and T. Schubert, *Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST)*. Methods, 2015.
52. Liu, J., D. Mazumdar, and Y. Lu, *A simple and sensitive "dipstick" test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. 45(47): p. 7955-9.
53. Stojanovic, M.N. and D.W. Landry, *Aptamer-based colorimetric probe for cocaine*. J Am Chem Soc, 2002. 124(33): p. 9678-9.
54. Cruz-Aguado, J.A. and G. Penner, *Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer*. J Agric Food Chem, 2008. 56(22): p. 10456-10461.

55. Rhouati, A., et al., *Aptamers: a promising tool for ochratoxin A detection in food analysis*. *Toxins* (Basel), 2013. 5(11): p. 1988-2008.
56. Turner, N.W., S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky, *Analytical methods for determination of mycotoxins: a review*. *Anal Chim Acta*, 2009. 632(2): p. 168-80.
57. Cruz-Aguado, J.A. and G. Penner, *Fluorescence Polarization Based Displacement Assay for the Determination of Small Molecules with Aptamers*. *Analytical Chemistry*, 2008. 80(22): p. 8853-8855.
58. Barthelmebs, L., et al., *Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine*. *Food Control*, 2011. 22(5): p. 737-743.
59. Yang, C., et al., *Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator*. *Biosens Bioelectron*, 2011. 26(5): p. 2724-7.
60. Vidal, J.C., et al., *An electrochemical immunosensor for ochratoxin A determination in wines based on a monoclonal antibody and paramagnetic microbeads*. *Anal Bioanal Chem*. 403(6): p. 1585-93.
61. De Girolamo, A., et al., *Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column*. *Food Chem*. 127(3): p. 1378-84.
62. Wu, S., et al., *Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels*. *Biosens Bioelectron*, 2011. 30(1): p. 35-42.
63. Rhouati, A., et al., *Development of an oligosorbent for detection of ochratoxin A*. *Food Control*, 2011. 22(11): p. 1790-1796.
64. Chapuis-Hugon, F., et al., *New extraction sorbent based on aptamers for the determination of ochratoxin A in red wine*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. 400(5): p. 1199-207.
65. *NeoVentures Biotechnology Inc., Aptamers Applied*. 2010 [cited 2015 14.10.]; Available from: <http://neovertures.ca/>.
66. Penner, G., *Commercialization of an aptamer-based diagnostic test*. *IVD Technology*, 2012(Nonclinical Diagnostics): p. 31-37.
67. Ricci, F., G. Adornetto, and G. Pallesch, *A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors*. *Electrochimica Acta*, 2012. 84: p. Volume 84, 1 December 2012, Pages 74–83.
68. Lv, Z., et al., *A simple and sensitive approach for ochratoxin A detection using a label-free fluorescent aptasensor*. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e85968.
69. Wang, Z., et al., *Electrochemiluminescent aptamer biosensor for the determination of ochratoxin A at a gold-nanoparticles-modified gold electrode using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as a luminescent label*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 398(5): p. 2125-32.
70. Wang, L., et al., *Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins*. *Chem Commun (Camb)*, 2011. 47(5): p. 1574-6.

71. Berthod, A., *Chiral recognition in separation methods : mechanisms and applications*. 2010, Heidelberg ; New York: Springer. xiv, 337 p.
72. Lane, A.N., et al., *Stability and kinetics of G-quadruplex structures*. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(17): p. 5482-515.
73. Chen, Y. and D. Yang, *Sequence, stability, and structure of G-quadruplexes and their interactions with drugs*. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2012. Chapter 17: p. Unit17 5.
74. Haider, S.M., G.N. Parkinson, and S. Neidle, *Structure of a G-quadruplex-ligand complex*. *J Mol Biol*, 2003. 326(1): p. 117-25.
75. Feigon, J., T. Dieckmann, and F.W. Smith, *Aptamer structures from A to zeta*. *Chem Biol*, 1996. 3(8): p. 611-7.
76. Hermann, T. and D.J. Patel, *Adaptive recognition by nucleic acid aptamers*. *Science*, 2000. 287(5454): p. 820-5.
77. Bishop, G.R., et al., *Energetic basis of molecular recognition in a DNA aptamer*. *Biophys Chem*, 2007. 126(1-3): p. 165-75.
78. Marshall, K.A., M.P. Robertson, and A.D. Ellington, *A biopolymer by any other name would bind as well: a comparison of the ligand-binding pockets of nucleic acids and proteins*. *Structure*, 1997. 5(6): p. 729-34.
79. Dunn, I.S., *Searching for molecular solutions : empirical discovery and its future*. 2010, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. xix, 458 p.
80. Neckers, L., M. Mollapour, and S. Tsutsumi, *The complex dance of the molecular chaperone Hsp90*. *Trends Biochem Sci*, 2009. 34(5): p. 223-6.
81. Lindquist, S., *Protein folding sculpting evolutionary change*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2009. 74: p. 103-8.
82. Trepel, J., et al., *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(8): p. 537-49.
83. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(10): p. 761-72.
84. Holzbeierlein, J.M., A. Windsperger, and G. Vielhauer, *Hsp90: a drug target?* *Curr Oncol Rep*, 2010. 12(2): p. 95-101.
85. Luo, W., A. Rodina, and G. Chiosis, *Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment?* *BMC Neurosci*, 2008. 9 Suppl 2: p. S7.
86. Pesce, E.R., et al., *Malaria heat shock proteins: drug targets that chaperone other drug targets*. *Infect Disord Drug Targets*, 2010. 10(3): p. 147-57.
87. Pearl, L.H. and C. Prodromou, *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery*. *Annu Rev Biochem*, 2006. 75: p. 271-94.
88. Matts, R.L. and J.R. Manjarrez, *Assays for identification of Hsp90 inhibitors and biochemical methods for discriminating their mechanism of action*. *Curr Top Med Chem*, 2009. 9(15): p. 1462-78.
89. Whitesell, L., et al., *Inhibition of Heat-Shock Protein Hsp90-Pp60(V-Src) Heteroprotein Complex-Formation by Benzoquinone Ansamycins - Essential Role*

- for Stress Proteins in Oncogenic Transformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. 91(18): p. 8324-8328.
90. Amolins, M.W. and B.S.J. Blagg, *Natural Product Inhibitors of Hsp90: Potential Leads for Drug Discovery*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2009. 9(2): p. 140-152.
 91. Matts, R.L., et al., *A systematic protocol for the characterization of Hsp90 modulators*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011. 19(1): p. 684-692.
 92. Tian, Z.Q., et al., *Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives*. Bioorg Med Chem, 2004. 12(20): p. 5317-29.
 93. Aherne, W., et al., *Assays for HSP90 and inhibitors*. Methods Mol Med, 2003. 85: p. 149-61.
 94. Du, Y., et al., *High-throughput screening fluorescence polarization assay for tumor-specific Hsp90*. J Biomol Screen, 2007. 12(7): p. 915-24.
 95. Megraud, F., *Antibiotic resistance in Helicobacter pylori infection*. British Medical Bulletin, 1998. 54(1): p. 207-216.
 96. Lubbecke, M., et al., *Aptamers as detection molecules on reverse phase protein microarrays for the analysis of cell lysates*. Engineering in Life Sciences, 2012. 12(2): p. 144-151.
 97. Walter, J.G., et al., *Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD*. Engineering in Life Sciences, 2010. 10(2): p. 103-108.
 98. Scheibel, T., et al., *ATP-binding properties of human Hsp90*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(30): p. 18608-18613.
 99. Rinehart, K.L., *Biosynthesis and Mutasynthesis of Aminocyclitol Antibiotics*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1979(Apr): p. 12-12.
 100. Shier, W.T., K.L. Rinehart, Jr., and D. Gottlieb, *Preparation of four new antibiotics from a mutant of Streptomyces fradiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. 63(1): p. 198-204.
 101. Donnelly, A. and B.S. Blagg, *Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket*. Curr Med Chem, 2008. 15(26): p. 2702-17.
 102. Eichner, S., et al., *New, highly active nonbenzoquinone geldanamycin derivatives by using mutasynthesis*. Chembiochem, 2009. 10(11): p. 1801-5.
 103. Eckl, J.M. and K. Richter, *Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights*. Int J Biochem Mol Biol. 4(4): p. 157-65.
 104. Taldone, T., et al., *Selective targeting of the stress chaperome as a therapeutic strategy*. Trends Pharmacol Sci, 2014. 35(11): p. 592-603.
 105. Hagn, F., et al., *Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53*. Nature Structural & Molecular Biology, 2011. 18(10): p. 1086-93.
 106. Neckers, L. and P. Workman, *Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?* Clinical Cancer Research, 2012. 18(1): p. 64-76.
 107. Prodromou, C., *The 'active life' of Hsp90 complexes*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2012. 1823(3): p. 614-23.

108. Miyata, Y., H. Nakamoto, and L. Neckers, *The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks*. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(3): p. 347-65.
109. Workman, P., *Overview: translating Hsp90 biology into Hsp90 drugs*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003. 3(5): p. 297-300.
110. Taipale, M., et al., *Chaperones as thermodynamic sensors of drug-target interactions reveal kinase inhibitor specificities in living cells*. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(7): p. 630-7.
111. Schax, E., et al., *Microarray-based screening of heat shock protein inhibitors*. *Journal of Biotechnology*, 2014. 180: p. 1-9.
112. Hermans, J., et al., *New, non-quinone fluorogeldanamycin derivatives strongly inhibit Hsp90*. *Chembiochem*, 2014. 16(2): p. 302-11.
113. Barbier, J., et al., *Isolation and total synthesis of icumazoles and noricumazoles--antifungal antibiotics and cation-channel blockers from Sorangium cellulosum*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012. 51(5): p. 1256-60.
114. Chen, X.J., et al., *Production and purification of firefly luciferase in Escherichia coli*. *Biotechnology Techniques*, 1996. 10(2): p. 89-92.
115. Walter, J.G., et al., *Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein-microarray applications*. *Analytical Chemistry*, 2008. 80(19): p. 7372-7378.
116. Karkkainen, R.M., et al., *Aptamers for safety and quality assurance in the food industry: detection of pathogens*. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011. 46(3): p. 445-454.
117. Walter, J.-G., et al., *Aptasensors for Small Molecule Detection*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 2012. 67b: p. 976-986.
118. Lonne, M., et al., *Aptamer-Modified Nanoparticles as Biosensors*. *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, 2014. 140: p. 121-154.
119. Witt, M., J.-G. Walter, and F. Stahl, *Aptamer Microarrays - Current Status and Future Prospects*. *Microarrays*, 2015. 4(2): p. 115-132.
120. Smuc, T., I.Y. Ahn, and H. Ulrich, *Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics*. *J Pharm Biomed Anal*, 2013. 81-82: p. 210-217.
121. Meyer, M., T. Scheper, and J.G. Walter, *Aptamers: versatile probes for flow cytometry*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. 97(16): p. 7097-7109.
122. Zhu, G. and J.-G. Walter, *Aptamer-Modified Magnetic Beads in Affinity Separation of Proteins*. *Methods in Molecular Biology, Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, 2015. 1286: p. 67-82.
123. Zhu, G.H., et al., *Characterization of Optimal Aptamer-Microarray Binding Chemistry and Spacer Design*. *Chemical Engineering & Technology*, 2011. 34(12): p. 2022-2028.
124. Urmann, K., et al., *Label-free optical biosensors based on aptamer-functionalized porous silicon scaffolds*. *Analytical Chemistry*, 2015. 87(3): p. 1999-2006.
125. Walter, J.G., F. Stahl, and T. Scheper, *Aptamers as affinity ligands for downstream processing*. *Engineering in Life Sciences*, 2012. 12(5): p. 496-506.

126. Loenne, M., et al., *Development of an Aptamer-based Affinity Purification Method for Vascular Endothelial Growth Factor*. Biotechnology Reports, 2015. submitted.
127. Kokpinar, O., et al., *Aptamer-Based Downstream Processing of His-Tagged Proteins Utilizing Magnetic Beads*. Biotechnology and Bioengineering, 2011. 108(10): p. 2371-2379.
128. Banerjee, J. and M. Nilsen-Hamilton, *Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research*. Journal of Molecular Medicine-Jmm, 2013. 91(12): p. 1333-1342.
129. Krammer, G., et al., *Method for isolating fragrance and flavour compounds*. European Patent Register, 2014. EP2742983 (A1)(EP20120196536 20121211).
130. Heilkenbrinker, A., et al., *Identification of the Target Binding Site of Ethanolamine-Binding Aptamers and Its Exploitation for Ethanolamine Detection*. Analytical Chemistry, 2015. 87(1): p. 677-685.
131. Dong, Y., et al., *Aptamer and its potential applications for food safety*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014. 54(12): p. 1548-61.
132. Amezcua, S., et al., *Ochratoxin A decontamination: A review*. Food Control, 2009. 20(4): p. 326-333.
133. Mateo, R., et al., *An overview of ochratoxin A in beer and wine*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 119: p. 79-83.
134. Communities, C.o.t.E., *Commission Recommendation (EC) No 594/2012 regulation 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants Ochratoxin A, non dioxin-like pcbs and melamine in foodstuffs*. Off. J. Eur. Commun., 2012. L176: p. 43-45.
135. Geng, X., et al., *Screening interaction between ochratoxin A and aptamers by fluorescence anisotropy approach*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405(8): p. 2443-2449.
136. Chen, J.H., et al., *A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer*. Food Control, 2012. 25(2): p. 555-560.
137. Kuang, H., et al., *Fabricated aptamer-based electrochemical "signal-off" sensor of ochratoxin A*. Biosensors & Bioelectronics, 2010. 26(2): p. 710-716.
138. Castillo, G., et al., *Impedimetric DNA Aptasensor for Sensitive Detection of Ochratoxin A in Food*. Electroanalysis, 2012. 24(3): p. 512-520.
139. Yang, C., et al., *Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator*. Biosensors & Bioelectronics, 2011. 26(5): p. 2724-2727.

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
<i>At/A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
BSA	Rinderalbumin
CBD	C-terminale Bindungsdomäne
CDD	C-terminale Dimerisierungsdomäne
CEO	Chief Executive Officer
CTP	Cytidintriphosphat
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
Da	Dalton
DADPA	Diamino-dipropylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	3-(Ethyliminomethylidenamino)-N,N-dimethyl-propan-1-amin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FITC	Fluorescein-5-sothiocyanat
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GA	Geldanamycin
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hHSP	Humanes Hitzeschockprotein

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSP	Hitzeschockprotein
HSP83	Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 83kDa
HSP90 α	Hitzeschockprotein 90 alpha
HtpG	Bakterielles Hitzeschockprotein G
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunoglobulin
IPI-504	Retaspimycinhydrochlorid
KcsA	Kalium-Kanals aus <i>Streptomyces lividans</i>
K _d	Dissoziationskonstante
MA	Microarray
MD	Mittlere Domäne
MST	MicroScale Thermophorese
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBD	N-terminale Bindungsdomäne
NCO	Negativkontrolloligonukleotid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
PU-H71	(8-[(6-iodo-1,3-benzodioxol-5-yl)sulfanyl]-9-[3-(propan-2-ylamino)propyl]purin-6-amine)
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEV	Tabakätzvirus
TP53	Tumorsuppressor-Gen 53
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Fig. 3.1 Graphische Darstellung des Hsp90 mit seinen Domänen als Monomer und Dimer (links); Kristallstruktur eines HSP90 Monomers aus Hefe in seiner ATP gebundenen Form.....	6
Fig. 3.2 Keilstrichformel des Ochratoxin A.....	13
Fig. 3.3 Vorhergesagten Strukturen der selektierten Aptamere H8, H12, H16, G3, G27 und des Aptamers 1.12.....	15
Fig. 3.4 Molekülstruktur einer G-Quadruplex mit Na ⁺ (A, lila Kugeln) und K ⁺ (B, grüne Kugeln) Ionen.....	16
Fig. 3.5 Das Aptamer gegen L-Argininamid in seiner gebunden und ungebunden Form.....	17
Scheme 4.1 Schematic representation of the direct competition assay using fluorescence-labeled ATP (Cy3-ATP) as reference.....	24
Scheme 4.2 Suzuki-Miyaura cross-coupling of bromo-geldanamycin derivatives 13 and 14, respectively, with boronic acid 27.....	32
Fig. 4.1 Selected structures of natural products 1-3 and 6-8 with Hsp90 inhibitory properties and clinical candidates 4, 5 and 9.....	28
Fig. 4.2 Dose-response curve of the competitive displacement assay for human HSP90 with FITC-GA and molecule 12, respectively, serving as displacement ligand (non-linear fit: logistic, fitting parameters: A1 = 0, A2 = 1).....	29
Fig. 4.3 Presentation of a protein microarray after the direct displacement assay with Cy3-ATP labeled proteins.....	29
Fig. 4.4 Dose-response curve of the competitive displacement assay with Cy3-ATP and ATP, respectively, serving as displacement ligand (non-linear fit: logistic, fitting parameters: A1 = 0, A2 = 1).....	30
Fig. 4.5 Structures of non-quinone geldanamycin derivatives 12–21 and macrolactons 22–26 obtained by mutasynthesis and tested here.....	32
Fig. 4.6 Dose–response curves of the direct competitive displacement assay for the HtpG of <i>H. pylori</i> using 12, 13, 15, radicicol 8 as ligands.....	33
Fig. 4.7 Dose-response curves of the direct competitive displacement assay for the human HSP90 α using 12 as ligand for testing the storage stability of the protein spotted microarray.....	35
Fig. 5.1 Structures of 17 AAG (1) and the non-quinone geldanamycin bromo-reblastin derivative (2) and 18-dehydrox-19-fluoro-reblastatin (3).	42
Fig. 5.2a Typical displacement assay of Cy3-ATP on AtHSP83 by geldanamycin derivative.....	42

Fig. 5.2b Heat map of the calculated IC ₅₀ values of HSP90 α from <i>H. sapiens</i> , HtpG from <i>H. pylori</i> and HSP83 from <i>A. thaliana</i> for several tested potential inhibitors in a competitive displacement assay.....	42
Fig. 5.2c Competitive assay of Cy3-ATP by geldanamycin derivative 18-dehydrox-19-fluoro-reblastatin [111] on cancer cell lysates.....	43
Fig. 6. 1 Reuse of the aptamer-modified clean-up column for four times: t ₀ = 1 st day, t ₁ = 2 nd day, t ₂ = 8 th day, t ₃ = 15 th day, t ₄ = 20 th day.	58
Fig. 6.2 Immobilization of Cy3-labeled aptamer (A) and OTA binding studies using unlabeled aptamer (B) via confocal microscopy.	59
Fig. 6.3 Optimization of the depletion and elution time of OTA with the aptamer 1.12.2 and an oligonucleotide used as a negative control (NCO).....	61
Fig. 6.4 Investigation of the binding behavior of aptamer 1.12.2 towards OTB.....	61
Fig. 6.5 Depletion of OTA from a complex sample using diluted (50% beer + 50% binding buffer) and undiluted beer.	63
Fig. 6.6 Aptamer 1.12.2 binding to OTA in different complex samples and the resulting K _D values.	64
Fig. 6.7 Calibration plot for OTA in the 0.05 to 5 μ M concentration range.	75
Fig. 6.8 Calibration plot for OTB in the 0.005 to 5 μ M concentration range.	76
Fig. 6.9 Aptamer 1.12.2 binding to OTA in binding buffer spiked with ethanol (4% and 12%) and the resulting K _D values (32.49, 126.20 and 287.37 nM)	76

Tabellenverzeichnis

Table 3.1 Selektierte RNA und DNA Aptamere gegen <i>small molecules</i> mit K_D -Werte im nanomolaren Bereich.....	11
Table 3.2 Eigenschaften von Aptameren und Proteinen zur Bindung eines <i>small molecules</i> im Vergleich. WW: Wechselwirkung.....	19
Table 4.1 Summary of the calculated IC_{50} values of Hsp90 α from <i>H. sapiens</i> and of HtpG from <i>H. pylori</i> and the specific Z^* -factors of each protein microarray.....	34
Table 6.2 K_D and K_D confidence values [nM] for different buffer conditions: increasing the amount of beer in the mixture of binding buffer and beer, and different pH values.	65

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Emilia Schax
Geburtsdatum	03.05.1987
Geburtsort	Biberach an der Riß
Nationalität	Deutsch

Ausbildung

02.2013 – 03.2016	Promotion Chemie und wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Betreuung Prof. Dr. Scheper
10.2010 – 12. 2012	Masterstudium Life Science (M. Sc.), Leibniz Universität Hannover, Abschlussnote: Sehr gut
08.2007 – 09.2010	Bachelorstudium Life Science (B. Sc.), Leibniz Universität Hannover, Abschlussnote: Ausgezeichnet
08.1999 – 07.2006	Campe-Gymnasium Holzminden, Abschluss: Abitur

Auslandserfahrungen

08.2006 – 07.2007	Au-pair in Irland
03.2011 – 04.2011	Forschungspraktikum: Charakterisierung von Acetylxylosterasen, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
08.2011 – 20.2012	Auslandssemester an der Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spanien