

---

# Neue Materialien und Methoden in der Protein-Microarray-Technologie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chem. Johanna-Gabriela Walter  
geboren am 01.05.1975 in Nienburg

2008

## **Referent**

Prof. Dr. T. Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

## **Korreferentin**

PD Dr. C. Kasper  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

## **Tag der Promotion**

20. Juni 2008

## **Erklärung**

Diese Arbeit wurde am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Deutschland, in der Zeit von Mai 2004 bis Januar 2008 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Frank Stahl durchgeführt. Der Verfasser versichert, die vorliegende Arbeit eigenständig durchgeführt und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben zu haben. Fremde Gedanken sind als solche kenntlich gemacht worden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>I. Membranadsorber als alternative Substrate für Protein-Microarrays</b>	<b>7</b>
<b>1. Protein-Microarrays</b>	<b>9</b>
1.1. Einleitung . . . . .	9
1.2. Fänger-moleküle auf Protein-Microarrays . . . . .	9
1.2.1. Antikörper . . . . .	9
1.2.2. Proteine . . . . .	10
1.2.3. Aptamere . . . . .	10
1.3. Anwendungen von Protein-Microarrays . . . . .	10
1.4. Formate . . . . .	11
1.4.1. Forward Phase . . . . .	12
1.4.2. Reversed Phase . . . . .	13
1.4.3. Sandwich Format . . . . .	13
1.5. Limitierungen . . . . .	14
1.6. Substrate für Protein-Microarrays . . . . .	14
1.6.1. Planare Substrate . . . . .	15
1.6.2. Dreidimensionale Substrate . . . . .	16
1.6.3. Nitrocellulose als Substrat für Protein-Microarrays . . . . .	16
<b>2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Membran-basierten Protein-Microarrays</b>	<b>19</b>
2.1. Auswertung der Microarray-Daten . . . . .	19
2.2. Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays . . . . .	20
2.2.1. Einfluss der Befestigung . . . . .	20
2.2.2. Einfluss der Porengröße . . . . .	22
2.2.3. Einfluss der Beschichtungsdicke . . . . .	22
2.2.4. Einfluss der Membranfarbe . . . . .	23
2.2.5. Optimiertes Microarray-Substrat . . . . .	23
2.3. Charakterisierung der entwickelten Microarrays . . . . .	24
2.3.1. Bestimmung der Eigenfluoreszenzen . . . . .	24
2.3.2. Das “Standardprotokoll” . . . . .	24
2.3.3. Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein . . . . .	25

2.3.4.	Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein . . . . .	25
2.3.5.	Vergleich mit kommerziellen Microarrays . . . . .	25
2.3.6.	Vergleich unterschiedlicher Spottingparameter . . . . .	25
2.4.	Anwendung der Membran-basierten Microarrays . . . . .	26
2.4.1.	Forward Phase Assays . . . . .	26
2.4.1.1.	Detektion His-getaggtter Proteine . . . . .	26
2.4.1.2.	Versuche zum Multiplexing . . . . .	27
2.4.2.	Reversed Phase Assays . . . . .	28
2.4.2.1.	Detektion His-getaggtter Proteine . . . . .	28
2.4.2.2.	Detektion von Antikörpern in Zellkulturüberständen . . . . .	30
2.4.3.	Sandwich Assays . . . . .	31
2.4.3.1.	Detektion von Antikörpern aus Zellkulturüberständen . . . . .	31
2.4.3.2.	Detektion von Differenzierungsmarkern in Zellkulturüberständen . . . . .	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays</b>	<b>35</b>
3.1.	Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays . . . . .	35
3.1.1.	Einfluss der Befestigungsmethode . . . . .	36
3.1.2.	Einfluss der Porengröße . . . . .	37
3.1.3.	Einfluss der Beschichtungsdicke . . . . .	38
3.1.4.	Einfluss der Membranfarbe . . . . .	38
3.1.5.	Optimiertes Microarray-Substrat . . . . .	39
3.2.	Charakterisierung der entwickelten Microarrays . . . . .	40
3.2.1.	Schwarze Nitrocellulose . . . . .	40
3.2.1.1.	Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein . . . . .	40
3.2.1.2.	Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein und Vergleich mit kommerziellen Microarrays . . . . .	41
3.2.2.	Weißer Nitrocellulose . . . . .	45
3.2.2.1.	Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein . . . . .	45
3.2.2.2.	Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein . . . . .	45
3.2.2.3.	Vergleich mit anderen Microarray-Oberflächen . . . . .	45
3.2.2.4.	Vergleich unterschiedlicher Spottingparameter . . . . .	45
3.3.	Anwendung der Membran-basierten Microarrays . . . . .	53
3.3.1.	Forward Phase Assays . . . . .	53
3.3.1.1.	Detektion His-getaggtter Proteine . . . . .	53
3.3.1.2.	Versuche zum Multiplexing im Forward Phase Format . . . . .	54
3.3.2.	Reversed Phase Assays . . . . .	56
3.3.2.1.	Detektion His-getaggtter Proteine . . . . .	56
3.3.2.2.	Detektion von Antikörpern in Zellkulturüberständen . . . . .	58
3.3.3.	Sandwich Assays . . . . .	60
3.3.3.1.	Detektion eines Antikörpers aus Zellkulturüberständen . . . . .	61
3.3.3.2.	Detektion von Collagen und Osteopontin in Zellkulturüberständen . . . . .	64
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick I</b>	<b>67</b>

<b>II. Aptamere als alternative Fängermoleküle auf Microarrays</b>	<b>69</b>
<b>1. Aptamere und ihre Anwendungen</b>	<b>71</b>
1.1. Entwicklung von Aptameren mittels SELEX . . . . .	71
1.1.1. DNA und RNA Aptamere sowie ihre Modifikationen . . . . .	74
1.1.2. Targets . . . . .	75
1.2. Eigenschaften von Aptameren . . . . .	75
1.2.1. Aptamere und Antikörper im Vergleich . . . . .	75
1.3. Interaktion mit dem Target / Faltungsmechanismen . . . . .	77
1.3.1. Aptamere gegen niedermolekulare Targets . . . . .	78
1.3.2. Aptamere gegen komplexere Protein-Targets . . . . .	79
1.3.3. Vergleich der Aptamer-Target Bindung mit der Protein-Target-Bindung	81
1.4. Anwendungen von Aptameren . . . . .	82
1.4.1. Medizinische und diagnostische Anwendungen . . . . .	82
1.4.2. Aptamere in der Biotechnologie . . . . .	83
1.4.3. Aptamere in der Sensorik . . . . .	84
1.4.4. Aptamer-basierte Microarrays . . . . .	84
<b>2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays</b>	<b>91</b>
2.1. Bereitstellung der verwendeten Proteine . . . . .	91
2.1.1. Transformation und Expression . . . . .	91
2.1.2. Proteinaufreinigung . . . . .	93
2.1.2.1. Proteinaufreinigung: Screening . . . . .	93
2.1.2.2. Proteinaufreinigung mittels FPLC . . . . .	94
2.1.3. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen . . . . .	95
2.1.3.1. Durchführung nach Herstellerangaben . . . . .	95
2.1.3.2. Protokolloptimierung . . . . .	96
2.1.3.3. Bestimmung der Markierungseffizienz . . . . .	96
2.1.3.4. Optimiertes Protokoll . . . . .	97
2.2. Charakterisierung der Aptamere . . . . .	98
2.2.1. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) . . . . .	98
2.2.2. Oberflächenplasmonresonanz (SPR) . . . . .	99
2.3. Immobilisierung von Aptameren auf unterschiedlichen Oberflächen . . . . .	101
2.3.1. Nachweis der Immobilisierung mit Sybr Green II . . . . .	101
2.3.2. Aptamere auf Aldehydslides . . . . .	102
2.4. Gerichtete Immobilisierung von Aptameren . . . . .	103
2.4.1. Aktivierung von Aptameren mit Cyanurchlorid . . . . .	103
2.4.1.1. Optimierung der Aktivierung mit Cyanurchlorid . . . . .	103
2.4.1.2. Optimiertes Protokoll zur Aktivierung . . . . .	104
2.4.1.3. Beschichtung von Aldehyd-Slides mit PEI . . . . .	104
2.4.1.4. Immobilisierung der aktivierten Aptamere . . . . .	104
2.4.1.5. Umpolung der Oberfläche . . . . .	104
2.5. Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem Target-Protein . . . . .	105
2.5.1. Optimiertes Protokoll für das 6H7 Aptamer . . . . .	105
2.6. Übertragung des Protokolls auf weitere Aptamere . . . . .	106

2.6.1.	Übertragung auf das 6H5 Aptamer . . . . .	106
2.6.2.	Übertragung auf das miniStrep Aptamer . . . . .	106
2.6.2.1.	Anpassung des Protokolls für das miniStrep Aptamer . . .	107
2.6.2.2.	Aufnahme einer Kinetik . . . . .	107
2.6.2.3.	Aufnahme der Temperaturabhängigkeit . . . . .	107
2.6.2.4.	Optimiertes Protokoll für das miniStrep-Aptamer . . . . .	107
2.6.3.	Übertragung auf das anti-Daunomycin Aptamer . . . . .	108
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays</b>	<b>109</b>
3.1.	His-getaggte Proteine und Aptamere gegen den His-Tag als Modellsystem .	109
3.1.1.	Bereitstellung der verwendeten Proteine . . . . .	109
3.1.1.1.	Transformation und Expression . . . . .	110
3.1.1.2.	Aufreinigung . . . . .	110
3.1.1.3.	Fluoreszenzmarkierung der Proteine . . . . .	111
3.1.2.	Charakterisierung der verwendeten Aptamere . . . . .	113
3.1.2.1.	Vorhersage der Sekundärstruktur . . . . .	113
3.1.2.2.	Isothermale Titrationskalorimetrie . . . . .	113
3.1.2.3.	Oberflächenplasmon Resonanz . . . . .	115
3.2.	Protokollentwicklung . . . . .	119
3.2.1.	Immobilisierung von Aptameren auf unterschiedlichen Oberflächen .	119
3.2.2.	Probleme bei der Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer aktiven Konformation . . . . .	121
3.2.3.	Ansätze zur Lösung der Faltungsproblematik . . . . .	121
3.2.3.1.	Gerichtete Immobilisierung von Aptameren . . . . .	122
3.2.3.2.	Bereitstellung eines zusätzlichen Spacers . . . . .	123
3.2.3.3.	Umpolung der Oberfläche . . . . .	124
3.2.4.	Optimierung des Protokolls . . . . .	126
3.2.4.1.	Optimierung der Aktivierung und Immobilisierung . . . . .	126
3.3.	Optimiertes Protokoll . . . . .	131
3.3.1.	Anwendung der entwickelten Methoden . . . . .	132
3.3.1.1.	Detektion weiterer Proteine . . . . .	132
3.3.1.2.	Übertragung der Methoden auf die Aptamer-basierte Chro- matographie . . . . .	135
3.3.2.	Übertragung der entwickelten Methoden auf andere Aptamere . . . .	135
3.3.2.1.	Nachweis His-getaggtter Proteine mit dem 6H5 Aptamer . .	136
3.3.2.2.	Aptamer-basierte Detektion von Streptavidin . . . . .	138
3.3.2.3.	Aptamer-basierte Detektion von Daunomycin . . . . .	141
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick II</b>	<b>145</b>
<b>Anhang</b>		<b>149</b>
<b>A. Materialien</b>		<b>151</b>
A.1.	Verwendete Puffer . . . . .	151
A.2.	Chemikalien . . . . .	151



A.3. Biomoleküle und Kits . . . . .	153
A.4. Microarray-Substrate . . . . .	153
A.5. Verbrauchsmaterialien . . . . .	153
A.6. Verwendete Geräte . . . . .	154
A.7. Verwendete Software . . . . .	155
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>161</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>
<b>Publikationen</b>	<b>179</b>
<b>Danksagung</b>	<b>181</b>



# Einleitung und Aufgabenstellung

Die Microarray-Technologie ermöglicht aufgrund des hohen Maßes an Miniaturisierung und Parallelisierung die Vermessung mehrerer Proben und/oder Parameter in einem einzigen Experiment. Bereits 1999 galten DNA-Microarrays als standardisiertes Verfahren zur Untersuchung von Expressionsmustern auf RNA-Ebene. Da das Proteom einer Zelle jedoch nicht das genaue Abbild des Expressionsmusters ist, wurden in den letzten Jahren die ersten Protein-Microarrays entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, Proteine auch in komplexen Proben zu detektieren. Herkömmliche Protein-Microarrays bestehen dabei aus Antikörpern, die auf einer Oberfläche immobilisiert sind und das in der Probe enthaltene Antigen selektiv binden. Ein limitierender Faktor ist dabei die Bereitstellung der Antikörper, die *in vivo* in Tieren oder Zelllinien hergestellt werden. Dabei sind Antikörper gegen toxische Substanzen oder intramolekulare Targets nicht oder nur schwer zugänglich. Darüber hinaus sind Antikörper, welche auf einer Oberfläche immobilisiert vorliegen nicht stabil und können unter Verlust ihrer Aktivität denaturieren. Im Rahmen dieser Dissertation sollen neue Methoden entwickelt werden, die die oben beschriebene Problematiken umgehen und zu robusteren Protein-Microarrays führen. Dabei werden im Wesentlichen zwei Ansätze verfolgt. So wird nach geeigneten Oberflächen zur Immobilisierung von Antikörpern gesucht, die die dreidimensionale Struktur der Antikörper stabilisieren und dabei nicht mit der Fluoreszenzdetektion der Target-Proteine interferieren. In einem weiteren Ansatz werden die empfindlichen Antikörper durch robustere Nukleinsäure-basierte Fängermoleküle ersetzt.

## **1. Bereitstellung neuer Oberflächen zur Immobilisierung von Antikörpern**

In der Microarray-Technologie werden üblicherweise planare Glas-Substrate zur Immobilisierung der Fängermoleküle genutzt. Auf diesen Oberflächen neigen empfindliche Biomoleküle wie Antikörper zur Denaturierung und somit zum Verlust ihrer Aktivität. Um dieses Problem zu umgehen, werden dreidimensionale Membran-basierte Microarray-Oberflächen entwickelt. Innerhalb der dreidimensionalen Struktur der Membran wird der Antikörper stabilisiert. Im Rahmen dieser Dissertation werden neuartige Membranen auf ihre Eignung zum Einsatz in der Protein-Microarray-Technologie untersucht. Das Material wird hinsichtlich seiner Eigenfluoreszenz optimiert, welche im Microarray-Experiment zu einem hohen Hintergrund und einer hohen Nachweisgrenze führt. Der neu entwickelte Membran-basierte Microarray wird charakterisiert und zur Analyse von Proteinen in komplexen Proben wie z.B. Zellkulturüberständen eingesetzt.

## **2. Ersatz der Antikörper durch stabilere Nukleinsäure-basierte Fängermoleküle**

Der Einsatz von Aptameren als Fängermolekül auf Protein Microarrays kann das Problem der geringen Stabilität von immobilisierten Antikörpern vermeiden. Unter Aptameren ver-

steht man kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Sequenzen, die mittels *in vitro* Selektion (SELEX, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) entwickelt werden. Ebenso wie Antikörper weisen auch Aptamere eine definierte dreidimensionale Struktur auf, die sie zur Bindung ihres Targets befähigt. Durch den Einsatz der *in vitro* Selektion sind Aptamere gegen beliebige Targets zugänglich. So können Aptamere auch gegen Toxine und wenig immunogene Substanzen generiert werden, gegen die Antikörper nur schwer erhältlich sind. Ein weiterer Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern besteht in ihrer größeren Stabilität, wodurch eine wesentlich höhere Langzeitstabilität der Microarrays erreicht werden kann. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines aptamerbasierten Microarrays zur Detektion von Proteinen. Als Modellsysteme werden zunächst gegen den His-Tag gerichtete Aptamere sowie verschiedene His-getaggte Proteine verwendet. Die Fähigkeit des Aptamers zur Bindung an das Target ist abhängig von der korrekten Faltung des Oligonukleotids. Daher muss eine geeignete Strategie zur Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer aktiven Konformation entwickelt werden. Die generelle Anwendbarkeit des mit dem Modellsystem entwickelten Protokolls wird durch Übertragung auf weitere Aptamere demonstriert.

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Dabei wird im ersten Teil die Entwicklung und Anwendung neuer Membran-basierter Microarray-Oberflächen beschrieben. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays zur Detektion von Proteinen dargestellt.

# Zusammenfassung

Protein-Microarrays stellen im Bereich der Proteom-Forschung eine viel versprechende Technik dar. Heute werden dabei zur Target-Erkennung hauptsächlich immobilisierte Antikörper verwendet. Ein Nachteil beim Einsatz von Antikörpern ist ihre eingeschränkte Stabilität. Antikörper neigen nach Immobilisierung zur irreversiblen Denaturierung, die den Einsatz von Antikörper-Microarrays limitiert. Um diese Einschränkung zu beheben, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Es werden neue Nitrocellulose-basierte Microarray-Oberflächen entwickelt, die zur Erhöhung der Stabilität der immobilisierten Antikörper beitragen. In einem weiteren Ansatz werden die empfindlichen Antikörper durch stabilere Nukleinsäure-basierte Fängermoleküle ersetzt.

Die Wahl einer geeigneten Oberfläche ist entscheidend für den erfolgreichen Einsatz von Protein-Microarrays. Dreidimensionale Oberflächen sind dafür bekannt, die native Konformation von immobilisierten Proteinen zu stabilisieren. Ein Nachteil der heute gebräuchlichen Nitrocellulose-basierten Microarrays stellt die hohe Autofluoreszenz dar. In dieser Arbeit wurden neue Nitrocellulose-basierte Microarrays entwickelt, die eine verminderte Autofluoreszenz aufweisen. Die Microarrays wurden charakterisiert und es wurden vergleichende Studien mit kommerziell erhältlichen Microarray-Oberflächen durchgeführt. Darüber hinaus wurden auf Basis des neuen Substrats Microarrays entwickelt, die die Detektion von Proteinen in komplexen Proben erlauben. Dabei wurden Forward Phase- und Reversed Phase Formate ebenso wie Sandwich Assays eingesetzt. So wurde z.B. IgG in Zellkulturüberständen im Reversed Phase Format detektiert. Dieser Assay erlaubte auch die Quantifizierung von IgG und zeigte eine gute Korrelation mit dem ELISA.

In einem weiteren Ansatz wurden durch Ersetzen des immobilisierten Antikörpers durch ein Aptamer Aptamer-basierte Protein-Microarrays entwickelt. Unter Aptameren versteht man kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide die viele Target-Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können. Auch Aptamere können denaturieren, allerdings verläuft dieser Prozess reversibel. Dadurch und durch die Möglichkeit der automatisierten Selektion von Aptameren stellen diese Oligonukleotide viel versprechende Fängermoleküle für Microarrays dar. His-getaggte Proteine und ein gegen den His-Tag gerichtetes Aptamer wurden als Modell-System verwendet. Die Orientierung des immobilisierten Aptamers ist entscheidend für die Bindung des korrespondierenden Targets. Als weitere entscheidende Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Ladung der Oberfläche sowie die *Spacer*-Länge identifiziert. Diese Parameter wurden systematisch untersucht und es wurde ein Aptamer-basierter Microarray zum Nachweis His-getaggtter Proteine entwickelt. Die universelle Anwendbarkeit der entwickelten Immobilisierungsstrategie wurde durch Anwendung auf vier verschiedene Aptamere demonstriert. Darüber hinaus wurde die Immobilisierungsstrategie erfolgreich auf *Magnetic Beads* übertragen, wodurch eine Affinitäts-Matrix zur Aufreinigung His-getaggtter Proteine etabliert werden konnte.

*Schlagwörter: Protein Microarray, Nitrocellulose Membran, Aptamer*



# Abstract

Protein microarrays are promising tools for proteomic research. Today, most approaches are based on the recognition of the target molecule by immobilized antibodies. One disadvantage of antibodies in protein microarray technology is their lack of stability. Antibodies tend to denature irreversibly when immobilized on a solid support. As a consequence, the common use of antibody arrays is limited. To overcome this limitation, two different approaches were applied. Novel nitrocellulose based microarray surfaces were developed in order to increase the stability of immobilized antibodies. In the other approach, the sensitive antibodies were replaced by more stable nucleic acid based capture molecules.

In protein microarray performance the choice of an appropriate surface is a crucial factor. Three dimensional surfaces like nitrocellulose are known to stabilize the native conformation of immobilized proteins. One disadvantage of today's nitrocellulose based microarrays is the high background fluorescence which interferes with the detection of proteins. In this study, novel nitrocellulose membrane based protein microarrays were developed that exhibit decreased autofluorescence. The microarrays were characterized and comparative experiments were performed utilizing various commercially available surfaces. Furthermore, the novel substrate was utilized to develop microarrays to detect proteins in complex mixtures. The detection was performed in forward phase and reversed phase format as well as in sandwich assays. For example, the detection of IgG in cell culture supernatant was performed in reversed phase format. This assay also allows the quantification of IgG and shows positive correlation with ELISA results.

In another approach, aptamer based protein microarray were developed by replacement of the capture antibody by an aptamer. Aptamers are short single-stranded DNA or RNA oligonucleotides that can bind to a wide range of target molecules with high affinity and specificity. As nucleic acids, aptamers can undergo denaturation, however the process is reversible. As a result of this stability and the possibility of automated selection of aptamers these oligonucleotides are highly promising capture molecules in microarray formats. His-tagged proteins and an aptamer directed against the his-tag were chosen as a model system. The orientation of the immobilized aptamer plays an important role in correct aptamer folding and thus, in effective binding of the corresponding target. Other important parameters identified in this work are the surface charge as well as the length of the spacer between aptamer and solid support. These parameters were systematically investigated resulting in the development of an aptamer based microarray for detection of his-tagged proteins. The general applicability of the developed immobilization strategy was demonstrated by the utilization of four different aptamers. Moreover, the immobilization strategy was successfully transferred to magnetic beads creating an affinity matrix for protein purification.

*Key words: Protein Microarray, Nitrocellulose Membrane, Aptamer*





Teil I.

# Membranadsorber als alternative Substrate für Protein-Microarrays



# 1. Protein-Microarrays

## 1.1. Einleitung

DNA-Microarrays sind heute das Mittel der Wahl für die Gen-Expressionsanalyse. Allerdings sind Informationen über das Expressions-Level nicht ausreichend zur Beschreibung des tatsächlichen Zellzustandes oder der Funktion eines Proteins. Zum einen ist die Korrelation zwischen der Transkription und der tatsächlichen Konzentration eines Proteins schwach. [55] Zum anderen können posttranslationale Modifikationen nicht auf dem RNA-Niveau unterschieden werden. Auch die Analyse von Bindungspartnern, die Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle sowie viele weitere Parameter sind durch die RNA-Expressionsanalyse nicht möglich. Deshalb wird in der Forschung zunehmend die Proteomanalyse im Microarray-Format vorangetrieben.

Probleme bei der Übertragung der Microarray-Technologie von der DNA- auf die Proteinebene treten z.B. bei der Ermittlung von einheitlichen Assaybedingungen auf. Während sich für unterschiedliche DNA- und RNA-Moleküle die optimalen Hybridisierungsbedingungen kaum unterscheiden, sind hoch parallelisierte Microarrays mit Proteinen schwieriger zu realisieren, da sich unterschiedliche Proteine in ihrer Löslichkeit und ihrem pH-Optimum beträchtlich unterscheiden können. Zusätzlich stellt die Verfügbarkeit und Reinheit von Proteinen eine Limitierung dar, ebenso wie die Funktionalität und native Konformation der auf dem Microarray immobilisierten Proteine. [101]

## 1.2. Fängermoleküle auf Protein-Microarrays

Ein Protein-Fängermolekül muss fähig sein, sein korrespondierendes Target unter tausenden weiteren in der Probe vorhandenen Proteinen spezifisch zu erkennen und so fest zu binden, dass die Bindung zum Target-Protein während der unterschiedlichen Assay-Schritte bestehen bleibt. Fängermoleküle müssen hochspezifisch sein und eine hohe Affinität aufweisen. Im folgenden werden einige auf Protein Microarrays häufig verwendete Fängermoleküle kurz vorgestellt (siehe auch Tabelle 1.1).

### 1.2.1. Antikörper

Antikörper stellen bis heute die am weitesten verbreiteten und am besten charakterisierten Fängermoleküle auf Microarrays dar. Dabei wird ausgenutzt, dass Antikörper gegen unterschiedliche Targets sich in ihrer Struktur ähneln, wodurch standardisierte Aufreinigungs- und Immobilisierungs-Bedingungen möglich sind und unterschiedliche Antikörper unter

gleichen Assay-Bedingungen verwendet werden können. Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern werden Hybridomzelllinien benötigt, deren Herstellung kosten- und zeitaufwändig ist. Monoklonale Antikörper sind spezifisch für ein Epitop des Targets, während polyklonale Antikörper multiple Epitop-Spezifitäten tragen.

Auch Antikörperfragmente wurden bereits erfolgreich als Fängermolekül auf Protein-Microarrays eingesetzt. F<sub>ab</sub> Fragmente können z.B. proteolytisch aus Antikörpern hergestellt werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der *in vitro* Selektion über Protein-Bibliotheken, die an der Oberfläche von Bakteriophagen mittels *Phage Display* exprimiert werden. *Phage Display* ermöglicht die im Vergleich zur Immunisierung von Tieren schnelle Isolierung von hoch affinen Molekülen gegen ein ausgesuchtes Target. Darüber hinaus sind mittels *Phage Display* auch toxische Proteine als Target einsetzbar, und es wird nur eine geringe Menge des Target-Proteins zur Selektion benötigt. Ein Nachteil von Antikörperfragmenten ist ihre geringe Löslichkeit und das häufig geringe Expressionslevel in *E. coli*. [125]

### 1.2.2. Proteine

Auf einem Microarray immobilisierte Proteine ermöglichen die Interaktionsanalyse mit anderen Proteinen oder niedermolekularen Substanzen. Die Verwendung von immobilisierten Proteinen auf Microarrays erlaubt z.B. die Detektion von Antikörpern in komplexen Proben. Dies ermöglicht u. a. die Analyse von Autoimmunerkrankungen und die Serumdiagnose von parasitären Erkrankungen oder Infektionen. [78, 109]

### 1.2.3. Aptamere

Eine Alternative zum Einsatz von Antigenen oder Antikörpern als Fängermolekül auf Arraysubstraten bietet die Anwendung von Aptameren. Unter Aptameren versteht man kurze einzelsträngige RNA- oder DNA-Moleküle, die in einem *in vitro* Prozess namens SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) entwickelt werden. [159] Aptamere kombinieren dabei die Vorteile von Nukleinsäuren und Proteinen: Wie Antikörper weisen sie hohe Affinitäten gegenüber ihrem Target auf und binden es aufgrund ihrer definierten dreidimensionalen Struktur. Als Nukleinsäuren lassen sie sich einfach synthetisieren und amplifizieren und können an definierten Positionen innerhalb ihrer Sequenz modifiziert werden, wodurch ihre gerichtete Immobilisierung auf einem Microarray-Substrat möglich ist. Ein wesentlicher Vorteil der Nukleinsäure-basierten Aptamere ist dabei ihre hohe Stabilität. Aptamere wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits erfolgreich als Fängermolekül auf Protein-Microarrays eingesetzt. [18, 20, 21, 152] Eine ausführlichere Darstellung von Aptameren und ihrem Einsatz auf Protein-Microarrays befindet sich in Teil II dieser Arbeit ab Seite 69.

## 1.3. Anwendungen von Protein-Microarrays

Bei den Protein-Microarrays können im wesentlichen analytische Microarrays und funktionelle Microarrays unterschieden werden. Beim analytischen Microarray können sowohl

Tabelle 1.1.: Vergleich verschiedener möglicher Fänger-moleküle für Protein-Microarrays nach Phelan und Nock 2003. [125]

Fänger-molekül	monoklonale Antikörper	polyklonale Antikörper	F <sub>ab</sub> Fragmente	Aptamere
Affinität	mittel - hoch	hoch	mittel	mittel - hoch
Spezifität	hoch	mittel - hoch	hoch	mittel-hoch
benötigte Targetmenge	hoch	hoch	gering	gering
Automatisierbarkeit	nein	nein	ja	ja
Entwicklungszeit	sehr lang	lang	kurz	kurz
Anmerkungen	teuer, lange Entwicklungszeit	heterogen	teuer	bisher selten verwendet

Antigene und Antikörper als auch Aptamere als Fänger-moleküle verwendet werden. Die analytischen Microarrays können für die Untersuchungen von Serumproben, Zelllysaten und lebenden Zellen, zur Analyse des Proteinexpressionslevels, zum *Protein Profiling* und im Diagnostikbereich eingesetzt werden.

Ein funktioneller Array findet bei der Untersuchung von Proteininteraktionen, post-translationalen Modifikationen oder auch beim Medikamentenscreening Verwendung. Ein Vorteil von *Protein Funktion Arrays* [83] gegenüber *in vivo* Studien ist, dass die experimentellen Parameter (pH, Temperatur, Ionenstärke, Anwesenheit und Konzentration von Cofaktoren etc.) gesteuert und kontrolliert werden können. Eine auf Protein-Microarrays basierte Funktionsstudie wurde z.B. von Ge et al. (2000) durchgeführt. Hier wurden 48 aufgereinigte humane Proteine immobilisiert und mit unterschiedlichen Proteinen, Nukleinsäuren und organischen Molekülen inkubiert. Dieser *Low Density Array* erbrachte u. a. neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von DNA mit unterschiedlich phosphorylierten Formen von Proteinen. [49] Von Zhu et al. (2001) wurde ein "*Yeast Proteome Chip*" publiziert, auf dem 5800 Proteine immobilisiert wurden. Auch dieser Array wurde für Interaktionsstudien genutzt. [172] Ein Microarray zum *Screening* von Proteininteraktionen ist über die Firma Invitrogen bereits kommerziell erhältlich. Der "ProtoArray<sup>TM</sup> Human Protein Microarray" kann für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden. Die Slides sind mit über 1800 humanen Proteinen bedruckt. Neben der Interaktionsanalyse können auch Substrate einzelner Proteine untersucht werden und Protein-Targets kleiner Moleküle entdeckt werden. [99]

## 1.4. Formate

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für den Nachweis des Target-Proteins in einer Probe unter Verwendung von Protein-Microarrays. Im folgenden Abschnitt werden unterschiedliche Strategien zur Detektion von Proteinen anhand unterschiedlicher Protein-Microarray Formate dargestellt (siehe Abb. 1.1).

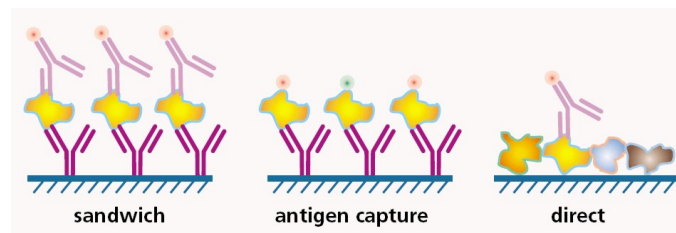


Abbildung 1.1.: Unterschiedliche Strategien zur Detektion von Proteinen im Microarray-Format. Quelle: MacBeath (2002). [98]

#### 1.4.1. Forward Phase

Beim Forward Phase Assay (entspricht dem *Antigen Capture* Format in Abbildung 1.1) werden Antikörper auf dem Microarray immobilisiert und zur Detektion ihrer Target-Proteine genutzt. Dabei wird entweder eine markierungsfreie Detektionsmethode wie die Oberflächenplasmon Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) verwendet, oder es ist notwendig alle Proteine in der Probe z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Die Anwendbarkeit dieses Formates wurde von Haab et al. (2001) demonstriert. [56] Dabei wurden 115 unterschiedliche Antikörper immobilisiert und mit definierten Mischungen der fluoreszenzmarkierten Target-Proteine inkubiert. Dabei beobachteten Haab et al., dass einige Antikörper geeignet waren, den Analyten in Konzentrationen von unter 1 ng/ml zu detektieren, allerdings zeigten nur 20% der verwendeten Antikörper bei einer Analytkonzentration von 1,6 µg/ml überhaupt Signale. Es ist also immer notwendig, die Funktionalität von Antikörpern, die auf einem Microarray immobilisiert wurden, empirisch zu bestimmen. Die Studie von Haab et al. zeigt außerdem, dass die Sensitivität des Forward Phase Microarrays eingeschränkt ist, da es zu keinerlei Signalamplifikation kommt. Ein weiteres Problem des Forward Phase Assays stellt das Labeling der Proteine dar: So werden in komplexen Mischungen nicht alle Proteine gleichmäßig gut markiert und manche Proteine werden unter Umständen bevorzugt an den zur Erkennung durch den Antikörper notwendigen Epitopen markiert. [98]

Dennoch wurde das Forward Phase Format bereits erfolgreich zur Beobachtung von Veränderung des Proteoms eingesetzt. Dabei wurde von Sreekumar et al. (2001) ein Zweifarbenexperiment mit Cy3-markiertem Lysat einer Karzinom-Zelllinie von unbehandelten Zellen und Cy5-markiertem Lysat von bestrahlten Zellen durchgeführt. Das Microarray-Experiment zeigte eine Reihe von bereits bekannten regulierten Proteinen und führte zur Entdeckung von 7 weiteren regulierten Proteinen. [151] Auch am RZPD (*German Resource Center for Genome Research GmbH*) werden Forward Phase Microarrays eingesetzt. Dabei werden immobilisierte Antikörper als Fängermolekül verwendet und es werden ebenfalls zwei Zustände miteinander verglichen. Dazu werden Zelllysate mit Cy3 und Cy5 gelabelt und im so genannten Dye-Swap-Experiment ermittelt, welche Proteine in welchem Zustand überexprimiert werden. Dadurch ist auch eine relative Quantifizierung von Proteinen möglich. [101] Nach der *Ambient Analyte Theory* die von Ekins beschrieben wurde, [32] weisen miniaturisierte Immunoassays wie Protein-Microarrays eine außerordentliche Sensitivität auf. Aufgrund der geringen absoluten Menge an immobilisiertem Fängermolekül wird nur ein geringer Anteil des Target-Proteins gebunden. Dadurch wird die Menge des Targets

nicht signifikant verändert, wodurch die Menge des gebundenen Targets direkt die Menge des Targets in Lösung wieder spiegelt.

### 1.4.2. Reversed Phase

Beim Reversed Phase Microarray wird kein Fängermolekül sondern die Probe selbst auf dem Microarray immobilisiert. Ein Problem stellt dabei häufig die Komplexität der zu immobilisierenden Probe sowie die unter Umständen sehr geringe Konzentration des zu untersuchenden Proteins in dieser Probe dar. Für Plasma wird ein dynamischer Bereich der Proteinkonzentrationen von  $10^{10}$  angenommen und wenige Proteine stellen die überwiegende Masse der Gesamtproteine dar. [1] So muss das zu untersuchende Protein mit anderen Proteinen um einen Bindungsplatz auf der Microarray-Oberfläche konkurrieren. Um dieses Problem zu umgehen wurde die Komplexität von Zellysaten von Madoz-Gurpide et al. (2001) zunächst durch chromatographische Fraktionierung verringert, bevor die Lysat-Fraktionen auf Microarrays immobilisiert wurden. [100] Dadurch wurde die Spezifität des direkten Assays erhöht, allerdings wird das Hochdurchsatz-Potential des Microarray-Formats durch die aufwändige Fraktionierung verringert.

Auch im Reversed Phase Format wurden bereits erste Ansätze zur relativen Quantifizierung von Proteinen publiziert. Dabei stellt der eher enge dynamische Bereich des Reversed Phase Arrays eine Herausforderung dar. Mircean et al. (2005) lösten dieses Problem, indem sie Lysate in Konzentrationsreihen spotteten und eine neue Methode zur robusten Bestimmung von Expressions-Verhältnissen entwickelten. [110] Reale Anwendungen findet das Reversed Phase Format vor allem im diagnostischen Bereich.

### 1.4.3. Sandwich Format

Im Sandwich Format werden Fängerantikörper auf dem Microarray-Substrat immobilisiert. Diese Antikörper binden das Target-Protein, welches mit Hilfe von weiteren markierten Antikörpern detektiert wird. Um diesen Assay-Typ realisieren zu können, sind also immer zwei Antikörper für jedes Target-Protein erforderlich, die unterschiedliche Epitope des Target-Proteins erkennen müssen. Dieses Format kann innerhalb gewisser Grenzen auch für Multiplex-Studien genutzt werden, indem mit Mischungen unterschiedlicher Detektionsantikörper gearbeitet wird. Dabei steigt jedoch die Gefahr von Kreuzreaktivitäten an. Ein Vorteil des Sandwich Formates ist, dass das zu untersuchende Proteingemisch nicht gelabelt werden muss. Dadurch wird die Probenvorbereitung erleichtert und der Probendurchsatz gesteigert. Darüber hinaus wird die Spezifität des Assays erhöht. Da die meisten Antikörper mit zellulären Proteinen Kreuzreaktionen eingehen können, führt dies im direkten Format und im Reversed Phase Format oft zu falsch-positiven Ergebnissen. Beim Sandwich-Assay wird die Spezifität durch Verwendung zweier Antikörper gegen das gleiche Target gesteigert. [98] Die Sensitivität ist beim Sandwich-Assay höher als beim Forward-Phase-Assay. So beobachteten Rubina et al. (2005), dass das Detektionslimit (LOD, *Limit of Detection*) durch Verwendung des Sandwich-Formats um den Faktor 2 bis 12 gesenkt wird. [139]

## 1.5. Limitierungen

Ein wesentlicher Vorteil des Microarray-Formates ist, dass prinzipiell tausende von Proteinen auf einem Microarray immobilisiert werden können, wodurch z.B. die Funktionen von tausenden Proteinen gleichzeitig unter minimalem Probenverbrauch untersucht werden können. Kopien des Arrays können nahezu beliebig oft gedruckt werden, wodurch es möglich ist, die selben Proteine mit unterschiedlichen potentiellen Interaktionspartnern zu inkubieren und dabei auch unterschiedliche Reaktionsbedingungen zu wählen. Dieses Potenzial zur Hochdurchsatzfähigkeit von Protein-Microarrays wird jedoch bis heute kaum genutzt. Bisher wurden hauptsächlich *Low Density Arrays* realisiert. Einen Engpass in der Entwicklung von Protein-Microarrays stellt heute die Bereitstellung geeigneter Antikörper bzw. anderer Fängermoleküle dar. Darüber hinaus sind zur Produktion von Antikörpern oder anderen Fängermolekülen zunächst die Target-Proteine in ausreichender Menge und Reinheit sowie in nativer Form notwendig. Auch die begrenzte Stabilität der verwendeten Fängermoleküle stellt eine Limitierung dar. Die Denaturierung von Antikörpern nach der Immobilisierung auf dem Microarray-Substrat führt zu Funktionseinbußen und kann auch zu Kreuzreaktivitäten beitragen.

Die Verwendung eines geeigneten Microarray-Substrates kann dabei zur Stabilisierung der nativen Konformation des immobilisierten Fängermoleküls beitragen.

## 1.6. Substrate für Protein-Microarrays

Die Methode zur Immobilisierung der Fängermoleküle ist entscheidend für den Erfolg eines Microarray-Experiments. Dabei können Proteine kovalent oder nicht-kovalent an die Microarray-Oberfläche gebunden werden. Nicht-kovalente hydrophobe Wechselwirkungen werden seit Jahren im ELISA-Format auf Polystyren oder beim Western-Blot auf Nitrocellulose zur Immobilisierung von Proteinen genutzt. Darüber hinaus können Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen z.B. auf Polylysin immobilisiert werden. Dabei besteht die Gefahr, dass Proteine z.B. durch Entfaltung auf der Oberfläche denaturieren können. Außerdem besteht bei nicht-kovalenter Bindung die Möglichkeit, dass die Proteine sich wieder von der Substratoberfläche lösen können. [89] Proteine können auch kovalent an die Oberfläche gebunden werden, um die Stabilität der Immobilisierung zu erhöhen. Dazu werden häufig aus der DNA-Microarray-Technologie bekannte Aldehyd- oder Epoxy-modifizierte Oberflächen verwendet, die kovalente Bindungen mit Amino-Gruppen des Proteins eingehen können. Auch bei der kovalenten Bindung von Antikörpern an modifizierte Glas-Substrate gibt es Hinweise auf eine mögliche Denaturierung. [123] Bei allen bisher erwähnten Methoden zur Immobilisierung wird das Protein in zufälliger Orientierung auf der Oberfläche gebunden. Daneben gibt es auch Ansätze zur gerichteten Immobilisierung von Proteinen, wobei durch gezielte und gerichtete Immobilisierung des Fängermoleküls die Dichte an funktionalem Fänger erhöht wird. Dazu verwendeten z.B. Peluso et al. (2003) biotinylierte Antikörper auf Streptavidin beschichteten Substraten. [123] Im Vergleich zur zufälligen Orientierung der Antikörper konnten die Signalintensitäten um den Faktor 5-10 erhöht werden. Die gerichtete Immobilisierung von Antikörpern ist auch unter Verwendung



Tabelle 1.2.: Möglichkeiten zur Bindung von Antikörpern an Oberflächen.

Methoden	Oberfläche	Bindungsmechanismus
Adsorption	Nitrocellulose, Poly-L-Lysin, Aminosilan, Polystyren	elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen
kovalent	Epoxy-, Aldehyd-, Carbodiimid-modifiziert	Reaktion mit primären Amingruppen von Lysin und Arginin
spezifische Bindung	Protein A, Protein G	Bindung über die F <sub>c</sub> Region
Einführung spezifischer Gruppen, vor allem Biotin	Streptavidin	spezifische Bindung

von mit Protein A oder Protein G beschichteten Substraten möglich. Dabei werden die Antikörper über ihr F<sub>c</sub> Fragment gebunden, wodurch die F<sub>ab</sub> Regionen gut zur Bindung des Target-Proteins zugänglich sind. [96] Die unterschiedlichen Strategien zur Immobilisierung von Proteinen auf Microarray-Substraten sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Die Oberfläche spielt außerdem eine Rolle für die unspezifische Bindung von in der Probe enthaltenen Proteinen und kann somit zur Sensitivität des Assays beitragen. Des Weiteren muss die Oberfläche homogen sein, um in jedem Spot die gleiche Menge Protein immobilisieren zu können. Darüber hinaus sollte die Oberfläche nicht mit der Detektionsmethode interferieren, d.h. im Falle der häufig verwendeten Fluoreszenzdetektion, dass das Material eine geringe Eigenfluoreszenz aufweisen sollte. [141] Auch die Hydrophobizität der Oberfläche ist entscheidend. So führen hydrophobe Oberflächen unter Umständen zur Denaturierung von Antikörpern. Darüber hinaus weisen hydrophobe Oberflächen ein stärkeres Maß an unspezifischer Bindung auf und tragen somit zu einem hohen Hintergrund bei.

Oberflächen die zur Herstellung von Protein-Microarrays eingesetzt werden lassen sich grob in planare und dreidimensionale Substrate unterteilen.

### 1.6.1. Planare Substrate

Zweidimensionale Microarray-Substrate bestehen üblicherweise aus Glas-Substraten, die über Amino-, Aldehyd- oder Epoxy-Modifikationen verfügen. Diese Substrate wurden direkt aus der DNA-Microarray-Technologie übertragen. Dabei führt die Verwendung von Glas-Substraten häufig zu einem Verschmieren der Spots, [145] dem jedoch durch geeignete Spottingpuffer und vor allem durch Zusätze von Detergenzien entgegengewirkt werden kann. [86] Vorteile von Glas-Substraten sind ihre Robustheit, ihre einfache Handhabung sowie die geringe Eigenfluoreszenz. [145] Ein Nachteil besteht in der großen Nähe zwischen immobilisiertem Biomolekül und der Oberfläche, wodurch es zu sterischen Hinderungen kommen kann. Vor allem weisen planare Oberflächen eine eher begrenzte Bindungskapazität auf. Die niedrige Bindungskapazität wirkt sich dabei auch limitierend auf den dynamischen Bereich des Assays aus. [86]

### 1.6.2. Dreidimensionale Substrate

Eine Reihe von dreidimensionalen Substraten wurde bereits erfolgreich für Protein-Microarrays eingesetzt. Unter diesen Substraten befinden sich unterschiedliche Membranen ebenso wie Gele. [139, 138] Auf den dreidimensionalen Substraten kann die Bindung entweder kovalent oder nicht-kovalent erfolgen. Die nicht-kovalente Bindung erfolgt dabei über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen. Für Gel-basierte Substrate konnten Rubina et al. (2005) mittels konfokaler Mikroskopie zeigen, dass die als Fängermoleküle verwendeten Antikörper vollständig im Gel verteilt werden und auch im Inneren der Gelmatrix die Erkennung des Targets stattfindet. [139] Somit erhöht die Verwendung von dreidimensionalen Substraten die Bindungskapazität pro Spot. Zudem beobachteten Rubina et al., dass Proteine nach Immobilisierung auf Hydrogelen für 6 Monate ohne Verlust an Aktivität gelagert werden können. [138] Die Verwendung von Gelen (Acrylamid, Agarose oder Gelatine), die aus bis zu 95% Wasser bestehen, wirkt dabei stabilisierend auf die dreidimensionale Struktur der Proteine. [141] Ein Nachteil von Gelen ist die Diffusionslimitierung, die lange Inkubationszeiten notwendig macht. [3]

Neben Gel-basierten Substraten stehen auch mikroporöse Membranen als dreidimensionale Microarray-Substrate zur Verfügung. Dabei wird vor allem Nitrocellulose verwendet. Die Vor- und Nachteile dieses Substrats werden im folgenden Abschnitt genauer dargestellt.

### 1.6.3. Nitrocellulose als Substrat für Protein-Microarrays

Nitrocellulose wird in der Molekularbiologie schon seit Jahrzehnten als Oberfläche zur Immobilisierung von Biomolekülen z.B. in Western-Blot-Anwendungen genutzt. [163] Hier zeichnen sich die Membranen durch eine große innere Oberfläche aus, wodurch ihre Bindungskapazität hoch ist. Durch die dreidimensionale Struktur der Membran wird die Stabilität der immobilisierten Biomoleküle bewahrt. Ein Beispiel dafür ist die Tatsache, dass kommerzielle immunologische Tests die Nitrocellulose als Substrat verwenden, mehrere Jahre haltbar sind. [157]

Chemisch betrachtet ist Nitrocellulose ein Cellulose-Polymer, in dem die Hydroxyl-Gruppen der Zucker durch Nitrat-Gruppen ersetzt wurden. Dabei ist Nitrocellulose in organischen Lösungsmitteln gut löslich, beim Verdampfen des Lösungsmittels entstehen dünne Filme. In diese Filme können Poren eingefügt werden, indem der organischen Nitrocellulose-Lösung z.B. Wasser zugesetzt wird. Die Porenbildung ist dabei ein Resultat der unterschiedlichen Verdunstung von Lösungsmittel und Wasser. [157] Das resultierende Polymer ist hydrophob, ein Zusatz von Netzmitteln wie z.B. SDS oder Triton X100 kann die Benetzbarkeit verbessern.

Nach Tonkinson und Stillman (2002) findet die Bindung von Proteinen an Nitrocellulose über hydrophobe Wechselwirkungen statt, somit ist ein Trocknen nach dem Spotten zur Immobilisierung der Fängermoleküle notwendig. Dabei ist der genaue Bindungsmechanismus jedoch bis heute unklar. [157, 141] Durch die mikroporöse Oberfläche kann im Vergleich zu planaren Substraten eine größere Proteinmenge je Spot immobilisiert werden.

[85] Dadurch können im Vergleich zu planaren Substraten wesentlich höhere Signalintensitäten erreicht werden. [78, 100, 87] Durch die hohe Bindungskapazität scheint Nitrocellulose auch für Reversed Phase Microarrays mit Lysaten einsetzbar. Madoz-Gurpide et al. (2001) untersuchten die Bindungseigenschaften von Amino- und Aldehyd-modifizierten Microarray-Oberflächen und verglichen sie mit Nitrocellulose-basierten FAST<sup>TM</sup> Slides (Schleicher&Schuell, heute Whatman, Dassel). Dabei beobachteten sie, dass beim FAST<sup>TM</sup> Slide auch Protein-Konzentrationen detektiert werden konnten, die auf den zweidimensionalen Substraten nicht nachweisbar waren. Darüber hinaus wurde das gespottete Protein nahezu quantitativ gebunden. [100] Schwieriger ist die Anwendung, wenn der Microarray mit komplexen Proben inkubiert werden soll, da unter diesen Umständen unspezifische Bindungen zu einem signifikanten Problem werden können. [77] Auch auf Nitrocellulose kann das Protein - ähnlich wie auf Hydrogelen - in wässriger Mikroumgebung seine native Konformation über längere Zeiträume beibehalten, der bedruckte Microarray bleibt unter geeigneten Bedingungen für mehrere Monate stabil. [141]

Nitrocellulose wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen als Substrat für Protein-Microarrays verwendet. [49, 78] Der seit einigen Jahren kommerziell erhältliche FAST<sup>TM</sup> Slide hat sich dabei als Oberfläche für Protein-Microarrays durchgesetzt. [154] Hier besteht das Substrat aus einer weißen Nitrocellulose-Membran. [153, 48] Ein häufig beobachtetes Problem mit FAST<sup>TM</sup> Slides ist die hohe Eigenfluoreszenz der Nitrocellulose-Membran. [154, 48, 87, 86] Die Ursache für die hohe Eigenfluoreszenz ist die poröse Struktur, die zur Lichtbrechung führt. [157] Ein Ansatz zur Reduktion der Eigenfluoreszenz ist die Reduktion der Membrandicke. So berichtete Schleicher&Schuell, dass durch Reduktion der Schicht-Dicke um 50% auf dem FAST<sup>TM</sup> Slide der Hintergrund reduziert werden konnte und die SNR (*Signal to Noise Ratio*) um den Faktor 3 erhöht werden konnte. [48]

## 1. *Protein-Microarrays*

## 2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Membran-basierten Protein-Microarrays

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung neuartiger Membran-basierter Protein-Microarrays. Im Folgenden werden die zur Entwicklung und Charakterisierung von Microarray Oberflächen verwendeten Methoden geschildert. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3 ab Seite 35 dargestellt.

### 2.1. Auswertung der Microarray-Daten

Microarrays wurden mit den Fluoreszenzscannern 428 Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) und GenePix 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) vermessen. Der 428 Array Scanner liefert dabei Falschfarbenbilder bei denen die Intensitäten gemäß Abbildung 2.1 als Farben dargestellt werden. Bei Verwendung des GenePix<sup>®</sup> 4000B wurde zum Scannen von Membransubstraten die Laser-Power auf 33% reduziert, um eine Beschädigung der Membranen zu vermeiden.

#### Bestimmung der Autofluoreszenz

Dabei wurden zur Vermessung der Eigenfluoreszenz Scanner-Einstellungen (PMT-Gain, Laser-Power) gewählt, bei denen es nicht zu gesättigten Signalen kam. Zum Vergleich verschiedener Materialien wurden alle Substrate unter Verwendung gleicher Scanner-Einstellungen gescannt.

#### Auswertung von Microarrays

Die Auswertung von Spots erfolgte mit der Software ImaGene<sup>™</sup> 5.5.3 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA). Dabei wurden insbesondere die Signalintensität (*Signal Mean*,



Abbildung 2.1.: Falschfarbendarstellung des Verlaufs der Signalintensität beim 428 Array Scanner (Affymetrix). Quelle: [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com).

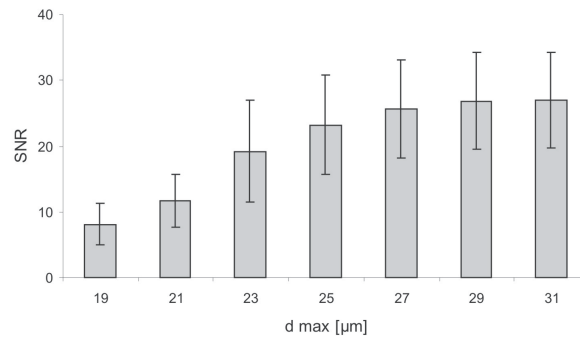


Abbildung 2.2.: Einfluss des in ImaGene<sup>TM</sup> gewählten maximalen Spot-Durchmessers auf die SNR.

SM), die relative Signalintensität (*Signal-Mean - Background Mean*, SM-BM) sowie die *Signal to Noise Ratio* (SNR) berücksichtigt. Der Vergleich unterschiedlicher Materialien bezüglich der resultierenden Signalintensitäten wurde bei gleichem PMT-Gain durchgeführt. Es wurden nur Scans in die Auswertungen einbezogen, auf denen keine gesättigten Pixel vorkommen. Die SNR wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

$$SNR = \frac{SM - BM}{Stdev.BG}$$

Dabei geht in die SNR auch die Standardabweichung des Hintergrundes (*Standarddeviation of Background*, Stdev. BG) ein. Als Detektionslimit wurde diejenige Konzentration definiert, die gerade noch zu einer  $SNR \geq 3$  führt. [164]

Die Bestimmung der  $SNR_{Max}$  und des LOD (*Limit of Detection*) wurde Gain-optimiert durchgeführt, da sich für unterschiedliche Materialien verschiedene optimale Gain-Einstellungen ergeben können. Dafür wurde jeder Microarray bei mehreren Gain-Einstellungen gescannt und der Scan zur Auswertung herangezogen, der zur höchsten SNR bzw. zum niedrigsten LOD führte. Die Abhängigkeit der SNR vom Gain ist in Abbildung 3.1 auf Seite 36 dargestellt. Darüber hinaus sind auch die in ImaGene<sup>TM</sup> eingegebenen Durchmesser der Spots für die erhaltenen SNR-Werte entscheidend (siehe Abb. 2.2). Dieser Parameter sollte also vorsichtig gewählt werden.

Allgemein wurden in Microarray-Experimenten von jedem Spot mindestens 5, meistens jedoch 10 Replikate erstellt. Aus den Werten dieser Spots wurden die Mittelwerte bestimmt, die Standardabweichungen der Werte sind in den Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt.

## 2.2. Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

### 2.2.1. Einfluss der Befestigung

Eine Fixierung der Substrate für Protein-Microarrays auf festen Trägern ist notwendig, da beim Aufdrucken der Proteinlösung und bei der Fluoreszenzdetektion durch die verwendeten Spotter bzw. den Fluoreszenzscanner vorgegebene Formate einzuhalten sind.

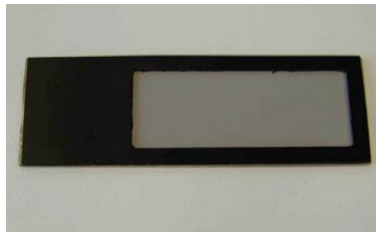


Abbildung 2.3.: Magnetrahmen aus Metallplatte und Magnetfolie. Quelle: Inka Praulich

Dabei werden üblicherweise die Abmessungen von in der Mikroskopie üblichen Objektträgern verwendet. Darüber hinaus ist die Handhabung von auf Glas-Objektträgern fixierten Membranen deutlich einfacher.

### **Einsatz eines Magnetrahmens**

Die Membranproben müssen für die Vorgänge Bedrucken und Auswerten auf Trägern fixiert werden. Um eine Beeinträchtigung der Membranen durch Klebstoffbestandteile zu verhindern, wurden die Membranproben ohne jegliche Verklebung getestet. Für die Tests mit unverklebten Materialien wurden spezielle Magnetrahmen eingesetzt (Abb. 2.3). Hierbei handelt es sich um Metallplatten (Scheden), auf die die zugeschnittene Membran aufgelegt wird. Die Fixierung der unverklebten Membran erfolgt durch eine Magnetfolie (Haas&Co Magnettechnik).

### **Einsatz von medizinischen Tapes und Sprühklebern**

Es wurden verschiedene von der Sartorius Stedim Biotech (Göttingen) zur Verfügung gestellte Membrankonstrukte getestet. Dabei wurden zur Fixierung der Membran auf dem Glas-Träger verschiedene Sprühkleber (Glorex, Tesa, Henkel) sowie wasserfestes doppelseitiges Klebeband (Tesa) verwendet. Es wurden auch Versuche mit medizinischen Tapes durchgeführt (adhesive research, arcare 7841 und 8890). Zur Bewertung der Verklebung wurde die Benetzbarkeit mit Wasser sowie die Wasserstabilität der Verklebung durch 24 stündiges Schütteln in ddH<sub>2</sub>O getestet. Zusätzlich wurde die Eigenfluoreszenz der Membranen vor Wasserkontakt und nach 45 min Blocken in PBS + 1% BSA und drei 5 minütigen Waschschritten (1\*PBS, 2\*ddH<sub>2</sub>O) vermessen. Hierbei wurden zusätzlich Verdünnungsreihen (20 µg/ml - 0,04 µg/ml, je 0,5 µl) von Penta His Alexa Fluor<sup>®</sup>555 und 647 manuell auf die Membran gespottet, um abschätzen zu können, wie stark die Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz durch die Verklebung mit der Detektion von Spots interferiert.

### **Befestigung mit einer Schmelzklebefolie**

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde am Institut für Technische Chemie eine Verklebungstechnik der Membranen entwickelt, die bei guter Wasserbeständigkeit zu niedrigen Hintergrundfluoreszenzen führt.<sup>1</sup> Das Protokoll zur Verklebung der Membran ist im folgenden dargestellt:

<sup>1</sup>Diplomarbeit von Gordien Redlich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Grundlegende Untersuchungen zu Protein Microarrays (2004)

Tabelle 2.1.: Zur Bestimmung des Einflusses der Porengröße verwendete Membranen.

Typbezeichnung	Porengröße [ $\mu\text{m}$ ]	Farbe	Membrandicke [ $\mu\text{m}$ ]
13004	0,8	schwarz	120 - 130
13006	0,45	schwarz	130 - 140
13027	0,22	schwarz	107 - 110

- Es wird eine Schmelzklebefolie (Miravithen D24, Leuna Polymer) verwendet. Diese wird entsprechend der gewünschten Feldgröße zugeschnitten.
- Auf die raue Seite dieser Schmelzklebefolie wird die ebenfalls zugeschnittene Membran gelegt und mit einer Schutzfolie bedeckt.
- Das Konstrukt aus Schmelzklebefolie, Membran und Schutzfolie wird auf einen auf  $59^\circ\text{C}$  vorgeheizten planaren Heizblock gelegt. Dabei liegt die glatte Seite der Schmelzklebefolie auf dem Heizblock auf. Das Konstrukt wird leicht auf den Heizblock aufgedrückt, bis sich Membran und Schmelzklebefolie verbunden haben.
- Das Konstrukt wird mit Hilfe des Uhu-Kraftkleber Gels auf einen Objektträger (Super-Frost, Menzel-Gläser, Braunschweig) geklebt.
- Die Slides werden vor dem Bedrucken über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

### Direkte Beschichtung der Glas-Substrate

Durch die Sartorius Stedim Biotech (Göttingen) wurde eine Methode zur direkten Beschichtung von Glaträgern mit Nitrocellulose entwickelt. Hierbei wird die flüssige Membranmasse mit einem Rackerel direkt auf spezielle Glasoberflächen gezogen. Es resultieren Schichtdicken von  $25\ \mu\text{m}$ .

#### 2.2.2. Einfluss der Porengröße

Es wurden Membranen unterschiedlicher Porengröße eingesetzt. Die Eigenschaften der verwendeten Membranen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Dazu wurden die schwarzen Membranen mit dem Magnethalter fixiert (siehe Abb. 2.3). Auf die Membran wurde mouse IgG in Konzentrationen zwischen  $2,5\ \text{mg/ml}$  und  $78\ \mu\text{g/ml}$  gespottet. Als spezifischer Bindungspartner wurde Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG verwendet. Der Versuch wurde nach dem Standardprotokoll (Siehe Abschnitt 2.3.2 auf Seite 24) durchgeführt.

#### 2.2.3. Einfluss der Beschichtungsdicke

Zur Bestimmung des Einflusses der Beschichtungsdicke wurde die Membran 13006 ( $0,45\ \mu\text{m}$  Porengröße) von der Sartorius Stedim Biotech in unterschiedlichen Schichtdicken auf eine Folie gezogen. Dabei wurden Membranstärken von  $60$ ,  $90$  und  $110\ \mu\text{m}$  erreicht.



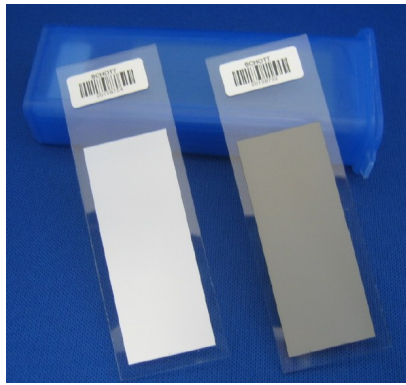


Abbildung 2.4.: Die mittlerweile über SCHOTT erhältlichen Schott Nexterion<sup>®</sup>Slides NC-W und NC-D. Quelle: [www.schott.com/nexterion](http://www.schott.com/nexterion).

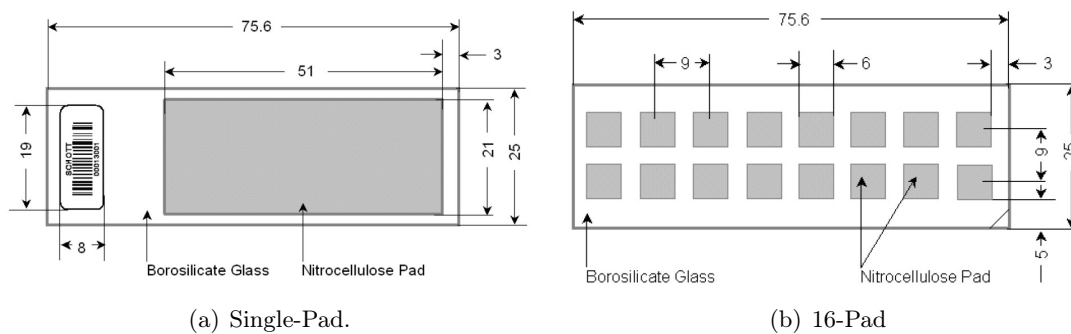


Abbildung 2.5.: Die Nexterion<sup>®</sup>Slides NC sind im single-Pad und 16-Pad Format erhältlich. Quelle: [www.schott.com/nexterion](http://www.schott.com/nexterion).

#### 2.2.4. Einfluss der Membranfarbe

Es wurden schwarze und weiße Membranen der gleichen Porengröße ( $0,22 \mu\text{m}$ ) verwendet. Die Eigenfluoreszenzen der Membranen wurden bei  $532 \text{ nm}$  und  $635 \text{ nm}$  bestimmt. Im Microarray-Experiment wurde mouse IgG ( $1 \text{ mg/ml}$ ) gespottet und es wurde Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG ( $3,3 \mu\text{g/ml}$ ) als Interaktionspartner verwendet. Pufferzusammensetzungen und Inkubationsbedingungen können Abschnitt 2.3.2 entnommen werden. In diesem Experiment wurden direkt beschichtete Slides (Schichtdicke  $25 \mu\text{m}$ ) verwendet.

#### 2.2.5. Optimiertes Microarray-Substrat

Die Sartorius Stedim Biotech (Göttingen) hat inzwischen in Kooperation mit SCHOTT Nexterion einen Nitrocellulose-basierten Microarray entwickelt. Dieser Microarray wird von der SCHOTT AG unter dem Namen Schott Nexterion<sup>®</sup>Slide NC vertrieben. Er ist mit schwarzer und weißer Membran und in zwei verschiedenen Membranformaten erhältlich (Abb. 2.4 und Abb. 2.5).

## 2.3. Charakterisierung der entwickelten Microarrays

### 2.3.1. Bestimmung der Eigenfluoreszenzen

Zur Bestimmung der Eigenfluoreszenzen wurden die Microarray-Oberflächen mit einem Fluoreszenzscanner (Fluoreszenzscanner 428 Array Scanner, Affymetrix oder GenePix<sup>®</sup>4000B, Axon Instruments) vermessen. Um unterschiedliche Microarray-Substrate vergleichen zu können, wurden innerhalb eines Vergleichs die gleichen Scanner-Einstellungen (Laser-Power, PMT-Gain) verwendet. Um aussagekräftige Werte zu erhalten, wurden dabei die Scanner-Einstellungen so gewählt, dass keine Sättigung der Signalintensität auftrat. Unter Verwendung des GenePix<sup>®</sup>4000B wurde die Laserstärke auf 33% reduziert, um eine Beschädigung der Membranen zu vermeiden.

### 2.3.2. Das "Standardprotokoll"

Das folgende Protokoll wurde von Gorden Redlich im Rahmen seiner Diplomarbeit entwickelt.<sup>2</sup> Soweit nicht anders angegeben wird dieses Protokoll für alle Forward Phase und Reversed Phase Experimente verwendet.

- Die zu spottende Protein-Lösung wird in PBS + 0,5% Trehalose angesetzt.
- Beim manuellen Spotten werden 0,5 µl der Protein-Lösung mit einer Pipette auf den Microarray aufgebracht. Beim automatischen Spotten mit dem Affymetrix 417<sup>TM</sup> Arrayer (Affymetrix) wird mit 8 hits/dot gespottet, wobei ein Gesamtvolumen von 800 pl je Spot übertragen wird.
- Die bedruckten Microarrays werden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Microarrays werden für 45 min mit PBS + 1% BSA geblockt.
- Es wird für 5 min mit PBS und zweimal für jeweils 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Wasserreste werden vom Microarray-Rand entfernt. Dabei wird darauf geachtet, dass die Membran nicht beschädigt wird und nicht austrocknet.
- Es wird eine Secure Seal Hybridisation Chamber (Grace Biolabs, Bend, OR, USA) auf den Microarray geklebt.
- Das Target-Protein wird in PBS + 0,2% TopBlock verdünnt. Die Hybridisierungskammer wird mit der Protein-Lösung befüllt. Dabei werden jeweils 800 µl verwendet. Eine Ausnahme stellen Microarrays dar, auf denen die Membran mit Schmelzklebefolie befestigt wurde. Hier werden 600 µl Protein-Lösung verwendet. Die Öffnungen der Hybridisierungskammer werden mit Adhesive Seal-Tabs (Invitrogen) verschlossen.
- Das Target-Protein wird für 16 h bei 25°C auf dem Microarray inkubiert. Dabei wird ein Eppendorf-Schüttler mit Slide-Aufsatz verwendet und es wird mit 300 rpm geschüttelt.

---

<sup>2</sup>Diplomarbeit von Gorden Redlich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Grundlegende Untersuchungen zu Protein Microarrays (2004)

Tabelle 2.2.: Als Vergleichs-Systeme verwendete Microarray-Substrate.

Oberflächentyp	Modifikation/Beschichtung	Bezeichnung	Hersteller
planar	Aldehyd	Schott Nexterion <sup>®</sup> Slide A1	SCHOTT
	Aminosilan	Schott Nexterion <sup>®</sup> Slide A	SCHOTT
dreidimensional	Polyacrylamid	Schott Nexterion <sup>®</sup> Slide H	SCHOTT
	NC-Film ( $\ll 1 \mu\text{m}$ )	Path <sup>™</sup> Slide	GenTel
	NC-Film ( $\gg 1 \mu\text{m}$ )	FAST <sup>™</sup> Slide	Whatman

- Der Microarray wird nach dem Entfernen der Inkubationskammer für jeweils 5 min mit 2\*SSC + 0,1% SDS, 1\*SSC und 0,5\*SSC gewaschen.
- Vor dem Scannen wird der Microarray im Druckluftstrom getrocknet.

### 2.3.3. Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein

Das Capture-Protein wurde in der gewünschten Konzentration gespottet. Die Konzentration des Target-Proteins wurde variiert. Die Versuche wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt (Abschnitt 2.3.2).

### 2.3.4. Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein

Zur Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein wurde das Capture-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen gespottet. Es wurde wiederum das Standardprotokoll für Microarrays verwendet. Zur Inkubation mit dem Target-Protein wurde die Konzentration gewählt, die bei der Bestimmung des Detektionslimits des Target-Proteins zur höchsten SNR führte.

### 2.3.5. Vergleich mit kommerziellen Microarrays

Es wurden vergleichende Untersuchungen mit diversen kommerziell erhältlichen Microarray-Substraten durchgeführt. Dabei wurden sowohl planare als auch dreidimensionale Substrate verwendet. Die verwendeten Substrate sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

### 2.3.6. Vergleich unterschiedlicher Spottingparameter

Der Einfluss der Spotting-Technik wurde durch Vergleich eines Kontaktdruckers (Affymetrix 417<sup>™</sup> Arrayer) und eines kontaktfreien Druckers (sciFLEXARRAYER S3) durchgeführt. Das Spotten der Microarrays mit dem kontaktfreien Drucker wurde dabei freundlicherweise von Dr. Uwe Andag (Sartorius Stedim Biotech) durchgeführt. Dabei wurden mit beiden Spottern je Spot 500 pl aufgetragen. Bei Verwendung des Kontaktdruckers wurden 8\*100 pl auf die Oberfläche aufgebracht. Die Experimente wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Abweichend davon wurden die Slides nach dem Drucken aus logistischen Gründen für 24 h inkubiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Spottingpuffer verwendet.

- PBS + 0,5% Trehalose
- PBS + 0,5% SDS
- PBS + 0,01% BSA
- Next Spot PB (kommerziell erhältlicher Spotting-Puffer von Schott)

## 2.4. Anwendung der Membran-basierten Microarrays

### 2.4.1. Forward Phase Assays

Bei Forward Phase Assays wird ein Fängermolekül - üblicherweise ein Antikörper - auf dem Microarray-Substrat immobilisiert und zum Nachweis des fluoreszenzmarkierten Target-Proteins verwendet.

#### 2.4.1.1. Detektion His-getaggtter Proteine

Zur Überprüfung der Labeling-Güte von His-Tag Proteinen wurde ein Forward Phase Assay zur Detektion His-getaggtter Proteine entwickelt. Dabei konnte neben der resultierenden Signalintensität und SNR auch ermittelt werden, ob das Labeling mit der molekularen Erkennung des His-Tags durch den Antikörper interferiert.

- Auf einem auf der schwarzen Nitrocellulosemembran 13004 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) basierten mit Schmelzklebefolie verklebten Protein Microarray wird ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS + 0,5% Trehalose mit 5 hits/dot in 10 Replikaten gespottet.
- Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Membran für 30 min mit 1% BSA in PBS geblockt.
- Danach wird einmal für 5 min mit PBS-Puffer und zweimal für jeweils 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Nachdem Wasserreste vom Glas entfernt wurden, wird eine Hybridisierungskammer (Secure Seal Hybridisation Chamber, Grace Biolabs) auf den Slide geklebt und mit 600 µL Hybridisierungspuffer bestehend aus PBS + 0,2% TopBlock, in dem das zu untersuchende gelabelte Protein in einer Konzentration von 2 µg/ml verdünnt wurde, befüllt. Die Öffnungen der Hybridisierungskammer werden mittels Adhesive Seal-Tabs (Invitrogen, Karlsruhe) verschlossen.
- Der Slide wird in einem Thermomixer comfort mit Slide Aufsatz (Eppendorf, Hamburg) für 16 h bei 25°C und 300 rpm inkubiert.
- Der Slide wird freigelegt und dreimal für jeweils 5 min mit 2\*SSC + 0,1% SDS, 1\*SSC und 0,5\*SSC gewaschen.
- Das Trocknen des Slides erfolgt im Druckluftstrom.

- Die Slides werden mit dem GenePix<sup>®</sup>4000B Scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) bei einer Laser Power von 33% unter Verwendung unterschiedlicher PMT-Einstellungen gescannt. Die Auswertung erfolgt mit ImaGene<sup>™</sup> 5.5.3 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA).

Die Bewertung der Labeling-Güte erfolgte auf Basis der erhaltenen Signalintensitäten und der SNR in Abhängigkeit von der D/P. Genauere Angaben zum Labeling von His-Tag Proteinen sowie eine Optimierung des Labelings sind in Abschnitt 2.1.1.3 in Teil 2 dieser Arbeit dargestellt.

Unter Verwendung des oben beschriebenen Microarrays wurden auch Experimente zur Stabilität von immobilisierten Antikörpern durchgeführt. Dazu wurde ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml auf die Microarrays gespottet. Neben der weißen Nitrocellulose wurden auch Aldehyd-modifizierte Slides (VSS-25 Silylated Slides, CEL Associates) und GAPS<sup>™</sup>-modifizierte Slides (Corning, Acton, MA, USA) eingesetzt. Als Interaktionspartner wurde Cy3-markiertes PFEI-His (1 µg/ml) verwendet. Die Bindungsstudie mit dem PFEI-His erfolgte am Tag der Immobilisierung sowie 8, 11 und 16 Tage später.

Um Variationen von Slide zu Slide zu vermeiden, wurde der Antikörper dazu in entsprechenden zeitlichen Abständen auf die selben Slides gedruckt. Zwischen den einzelnen Druckvorgängen wurden die Slides bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

### 2.4.1.2. Versuche zum Multiplexing

Auf Membran-basierte, direkt beschichtete Microarrays mit schwarzer Membran der Porengröße 0,22 µm wurden die folgenden Proteine in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 8 hits/dot gespottet:

- Bgl-His
- goat anti-Streptavidin IgG
- mouse IgG
- BSA
- FCS

Die Bearbeitung der Microarrays erfolgte nach dem Standardprotokoll unter Verwendung folgender Target-Proteine, Negativ-Kontrollen sowie Protein-Gemische:

- 20 ng/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG
- 1 µg/ml Streptavidin Cy5
- 3,33 µg/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>555 Penta His Antikörper
- 20 ng/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG + 1 µg/ml Streptavidin Cy5
- 1,5 µg/ml Cy5-markiertes humanes Serum
- 20 ng/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG + 1,5 µg/ml Cy5-markiertes humanes Serum

Das humane Serum wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Martijn van Griensven (Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Wien) zur Verfügung gestellt. Die Fluoreszenzmarkierung des humanen Serums erfolgte mit dem BD Clontech Protein Extraction & Labeling Kit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben.

### 2.4.2. Reversed Phase Assays

Bei Reversed Phase Microarrays - auch Lysat Microarrays genannt - wird das zu untersuchende Protein bzw. die zu untersuchende Proteinmischung auf dem Microarray immobilisiert. Die Detektion erfolgt direkt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

#### 2.4.2.1. Detektion His-getagter Proteine

Es wurden Versuche zur Detektion von His-Tag Proteinen im Reversed Phase Format durchgeführt. Dazu wurde Bgl-His in unterschiedlichen Konzentrationen (585 µg/ml - 0,3 µg/ml) gedruckt. Zusätzlich wurden verschiedene einer Aufreinigung entstammenden Fraktionen auf den Microarray gespottet. Die Aufreinigungen wurden von Jin Meng im Rahmen ihrer Masterarbeit auf der Theonxy-Plattform durchgeführt.<sup>3</sup> Dabei wurde Bste-His aus *E. coli*-Lysaten aufgereinigt.

Die Durchführung der Microarray-Experimente erfolgte nach dem Standardprotokoll (Abschnitt 2.3.2). Die Detektion der His-Tag Proteine erfolgte mit 4 µg/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>647 Penta His Antikörper.

##### 2.4.2.1.1. Produktion und Aufreinigung des Standardproteins

#### Expression von Bgl-His

- Alle Kultivierungen wurden in LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) durchgeführt. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Systec V-150, Systec GmbH, Wettenberg) für 20 min bei 121°C und  $1.013 \cdot 10^5$  Pa autoklaviert.
- Nach Abkühlen des Mediums wurde sterilfiltriertes Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.
- Übernacht-Vorkulturen wurden mit Gefrierkulturen angeimpft, die Hauptkulturen mit 0,5 ml der Vorkultur auf 100 ml LB-Medium.
- Alle Kultivierungen wurden bei 120 rpm und 30°C durchgeführt. Zur Verfolgung des Wachstums wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen.
- Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert (Konzentration im Medium: 1 mM).

---

<sup>3</sup>Masterarbeit von Jin Meng, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Micro-scale Aufreinigung his-getagter Proteine mit Ni-NTA magnetic Agarosebeads auf einer Theonxy-Plattform (2006)

- Nach Beendigung der Kultivierungen wurden die Bakterien von ihren Flüssigmedien durch Zentrifugation (30 min bei 4°C und 3345 g) abgetrennt.
- Die Überstände wurden sterilfiltriert.
- Die Pellets wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Ultraschall (60 W, 6 min, 0,3 s Pulsdauer) unter Eiskühlung aufgeschlossen.
- Nach 30 min Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 14000 g wurden die erhaltenen Lysate ebenfalls sterilfiltriert.

### Aufreinigung

Als Standardprotein wurde Bgl-His verwendet. Die Proteinaufreinigung wurde mittels FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD) durchgeführt. Als Chromatographiemedium wurden dabei Membranadsorbereinheiten (Sartobind IDA 75, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) eingesetzt. Der Chromatographie-Prozess wurde durch Messung mit dem Durchflussdetektor bei 280 nm verfolgt. Für die Aufreinigung wurde eine Flußrate von 1 ml/min verwendet. Alle verwendeten Puffer sowie die Kulturüberstände wurden vor der Aufreinigung sterilfiltriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 510 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) entgast.

Für die Aufreinigung von Bgl-His wurden folgende Puffer verwendet:

- Equilibrierungspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5
- Metallsalzlösungen: 0,1 M CoCl<sub>2</sub>, 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5
- Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8
- Elutionspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, 0,1 M Imidazol, pH 4,5

Durchführung der Aufreinigung:

- Die Sartobind IDA 75 Einheit wurde mit 10 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.
- Die Einheit wurde mit 10 ml der Metallionenlösung beladen.
- Um nicht gebundenes Metall zu entfernen, wurde mit 20 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.
- Die Einheit wurde mit 20 ml Bindungspuffer gespült.
- Die Probe wurde in dem Bindungspuffer verdünnt und über die Membranadsorbereinheit geleitet.
- Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer.
- Zur Regeneration der Membran wurde mit 10 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und die Metallionen wurden mit 10 ml 1 M Schwefelsäure entfernt.
- Die Membran wurde mit 20 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.

Der Aufreinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Das aufgereinigte Protein wurde unter Verwendung von Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (3 kDa MWCO, Sartorius Stedim Biotech) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert. Die Konzentration der resultierenden Protein-Lösung wurde mit dem Nanodrop ND-1000 bestimmt.

#### 2.4.2.2. Detektion von Antikörpern in Zellkulturüberständen

Es wurden Versuche zur Detektion von Antikörpern im Reversed Phase Format durchgeführt. Dazu wurde mouse IgG in unterschiedlichen Konzentrationen (250 µg/ml - 0,5 µg/ml) aufgetragen. Zusätzlich wurden verschiedene Zellkulturüberstände auf den Microarray gespottet. Die Zellkulturüberstände entstammten einer Kultivierung von mouse Hybridomzellen (IVF 19.23) in serumfreiem Medium mit minimalem Proteingehalt (Hybridoma-SFM, Gibco). Die Zellen produzieren einen gegen Penicillin Amidase aus *E. coli* ATCC 11105 gerichteten Antikörper. Die Kultivierungen wurden von Larissa Behr und Fabienne Anton im Rahmen ihrer Dissertationen durchgeführt.<sup>45</sup>

Die Durchführung der Microarray-Experimente erfolgte nach dem Standardprotokoll (Abschnitt 2.3.2). Die Detektion der immobilisierten Antikörper erfolgte mit 20 ng/ml Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG.

##### 2.4.2.2.1. ELISA

Die Konzentration des gegen Penicillin G Amidase gerichteten Antikörpers in den Zellkulturüberständen wurde zusätzlich mit einem Mouse-IgG-ELISA ermittelt (Roche Applied Science). Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Abweichend davon wurde jedoch nicht das im Kit enthaltene Standardprotein zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet sondern das selbe mouse IgG, das auf dem Microarray als Standard verwendet wurde (mouse IgG, Zymed Laboratories Inc.).

Durchführung Mouse-IgG-ELISA:

- Es werden in jedes Well einer MicroWell Platte (Nunc GmbH) 50 µl der Capture-Antikörper-Lösung pipettiert. Die Platte wird für 30 min unter Schütteln inkubiert.
- Die Lösung wird entfernt und es wird dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen.
- In jedes Well werden 200 µl Blocking Reagent pipettiert, es folgt eine 15 minütige Inkubation unter Schütteln.
- Das *Blocking Reagent* wird entfernt und es wird dreimal mit jeweils 200 µl *Wash Solution* gewaschen.
- Die Standardlösungen bzw. die 1:1000 verdünnten Zellkulturüberstände werden in die Wells pipettiert. Zur Verdünnung der Lösungen wird das im Kit enthaltene *Blocking Reagent* verwendet.
- Die Lösungen werden für 30 min unter Schütteln inkubiert.
- Die Lösungen werden entfernt und es wird dreimal mit jeweils 200 µl *Wash Solution* gewaschen.
- In jedes Well werden 50 µl *Conjugate Solution* pipettiert. Es folgt eine 30 minütige Inkubation.

---

<sup>4</sup>Dissertation von Fabienne Anton, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

<sup>5</sup>Dissertation von Larissa Behr, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)



- Die *Conjugate Solution* wird entfernt und es wird dreimal mit jeweils 200 µl *Wash Solution* gewaschen.
- In jedes Well werden 50 µl *Substrat Solution* pipettiert, es wird für 30 min unter Schütteln inkubiert.
- Die Detektion erfolgt in einem Plattenleser (Fluoroskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 405 nm.

### 2.4.3. Sandwich Assays

Im Sandwich-Format werden Fängerantikörper auf dem Microarray-Substrat immobilisiert. Diese Antikörper binden das Target-Protein, welches mit Hilfe von weiteren markierten Antikörpern detektiert werden. Ein Vorteil des Sandwich-Formates ist, dass das zu untersuchende Proteingemisch nicht gelabelt werden muss. Dadurch wird die Probenvorbereitung erleichtert und der Probendurchsatz gesteigert. Darüber hinaus wird die Spezifität des Assays durch Verwendung von zwei Antikörpern erhöht. [98] Die Sensitivität ist beim Sandwich-Assay dabei im allgemeinen höher als beim Forward-Phase-Assay. [139]

#### 2.4.3.1. Detektion von Antikörpern aus Zellkulturüberständen

Es wurden Versuche zur Detektion von Antikörpern aus Zellkulturüberständen durchgeführt. Als Fängermolekül wurde dabei Penicillin G Amidase (Sigma) verwendet. Das Target war ein gegen Penicillin G Amidase gerichteter Antikörper (anti PenG). Dieser Antikörper wurde unter Verwendung einer Protein G-Säule (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare) aus Zellkulturüberständen aufgereinigt. Die Zellkulturüberstände entstammten einer Kultivierung von mouse Hybridomzellen (IVF 19.23) in serumfreiem Medium mit minimalem Proteingehalt (Hybridoma-SFM, Gibco). Die Zellen produzieren einen gegen Penicillin Amidase aus *E. coli* ATCC 11105 gerichteten Antikörper. Die Kultivierungen wurden von Larissa Behr und Fabienne Anton im Rahmen ihrer Dissertationen durchgeführt. Die Detektion des gebundenen anti PenG wurde mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG durchgeführt.

##### 2.4.3.1.1. Aufreinigung des Standardproteins

Die Aufreinigung des Antikörpers erfolgte mit einer HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) Säule. Die Proteinaufreinigung wurde mittels FPLC (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD) durchgeführt. Der Chromatographie-Prozess wurde durch UV-Messung mit dem Durchflussdetektor bei 280 nm verfolgt. Für die Aufreinigung wurde eine Flußrate von 1 ml/min verwendet. Alle verwendeten Puffer sowie die Kulturüberstände wurden vor der Aufreinigung sterilfiltriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 510 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) entgast.

Verwendete Puffer:

- Bindungs-Puffer: 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0
- Elutions-Puffer: 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
- Neutralisierungs-Puffer: 1 M Tris, pH 9,0

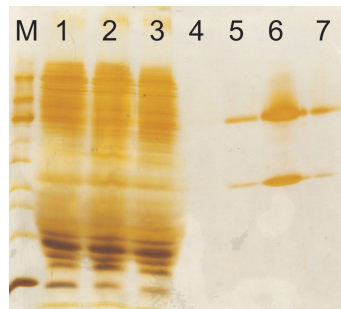


Abbildung 2.6.: Beurteilung der Aufreinigung mittels SDS-PAGE. Aufgetragen wurden folgende Fraktionen: (M) Molekulargewichtsmarker, (1) Zellkulturüberstand, (2) und (3) Durchlaufaktionen, (4) Waschfraktion, (5)-(7) Elutionsfraktionen. Quelle: Claas Haake.

Durchführung:

- Vor der Aufreinigung werden die Zellkulturüberstände unter Verwendung einer *Cross-Flow* Membraneinheit (Vivaflow Konzentratoren, 30 kDa MWCO, Sartorius) aufkonzentriert.
- Der Überstand wird in 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0 verdünnt.
- Die Säule wird mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Der Zellkulturüberstand wird über die Säule geleitet.
- Die Säule wird mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Es wird mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Den Elutionen werden 10% Neutralisationspuffer zugegeben.
- Die Säule wird mit 10 ml Bindungspuffer und anschließend mit 20% Ethanol gewaschen. Die Säule wird bei 4°C in 20% Ethanol gelagert.
- Der Aufreinigungserfolg wird mittels SDS-PAGE bestimmt (siehe Abb. 2.6)

Das aufgereinigte Protein wurde unter Verwendung von Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren 3 kDa MWCO (Sartorius) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert. Die Konzentration der resultierenden Protein-Lösung wurde mit dem Nanodrop ND-1000 bestimmt.

#### 2.4.3.1.2. Protokoll für die Detektion von anti PenG im Sandwich Format

In Anlehnung an das von Reck et al. (2007) publizierte Protokoll eines Sandwich Assays zur Detektion von Interferon-gamma wurde das folgende Protokoll entwickelt und bezüglich der verwendeten Konzentrationen an PenG und Detektionsantikörper optimiert: [134]

- Penicillin G Amidase (Sigma) wird in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS + 0,5% Trehalose auf einem Nitrocellulose-basierten Microarray gespottet. Je Spot werden mit 8 hits/dot insgesamt 800 pL aufgetragen.
- Der Microarray wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es wird für 30 min mit PBS + 1% BSA geblockt.
- Der Microarray wird dreimal für je 5 min PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.

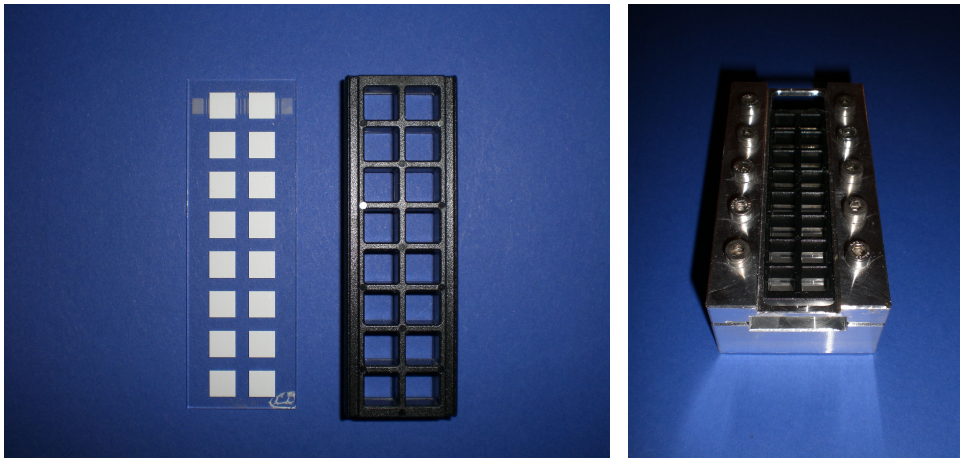


Abbildung 2.7.: 16-Pad Slide und ProPlate Slide Module sowie die Apparatur zur Fixierung der Hybridisierungskammer.

- Die Inkubation mit anti PenG erfolgt für 2 h mit 800  $\mu$ l anti PenG Lösung in PBS + 0,2% TopBlock bei 25°C.
- Es wird dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.
- Die Inkubation mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG (2  $\mu$ g/ml) in PBS + 0,2% TopBlock erfolgt für 2 h bei 25°C.
- Der Microarray wird erneut dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.
- Abschließend werden die Slides im Druckluftstrom getrocknet.

Darüber hinaus wurde das Protokoll zur Anwendung auf 16-Pad Microarrays modifiziert. Hierzu wurde eine 16-Well Inkubationskammer (ProPlate Slide Module, Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA) verwendet. Zur klebstofffreien Befestigung der Kammer auf dem Microarray wurde durch die Werkstatt des Instituts für Technische Chemie eine Metallapparatur entworfen und gebaut (Abb 2.7).

#### 2.4.3.1.3. Übertragung des Protokolls auf das 16-Pad Format

Die Anwendung des 16-Pad Microarrays erfolgte wie oben beschrieben. Dazu wurde auf jedes der 16 Felder PenG gespottet. Die Inkubationen mit anti PenG und dem Detektionsantikörper erfolgte in jedem Reaktionsraum der Kammer getrennt voneinander mit einem Volumen von jeweils 200  $\mu$ l. Um Kreuzkontaminationen von Well zu Well zu vermeiden, wurden die Lösungen unter Verwendung einer 8-Kanal-Pipette aus den einzelnen Wells entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass der bedruckte Bereich der Membran nicht mit der Pipettenspitze berührt wird. Anschließend wurde jedes Well einzeln dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen, bevor diese Waschschrte nach Entfernung der Hybridisierungskammer wiederholt wurden.

#### 2.4.3.2. Detektion von Differenzierungsmarkern in Zellkulturüberständen

In Anlehnung an das oben beschriebene Protokoll zur Detektion von anti PenG wurden Microarrays zur Detektion von humanem Collagen I und Osteopontin aus Zellkulturüberstän-

den entwickelt. Es wurden Kulturüberstände der humanen Osteosarkomzelllinie SAOS-2 verwendet. Die Kultivierungen wurden in DMEM + 10% FCS von Solvig Diederichs im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.<sup>6</sup>

- Monoklonale anti Collagen I bzw. anti Osteopontin-Antikörper werden in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS + 0,5% Trehalose auf einem Nitrocellulose-basierten Microarray gespottet. Je Spot werden mit 8 hits/dot insgesamt 800 pL aufgetragen.
- Der Microarray wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es wird für 30 min mit PBS + 1% BSA geblockt.
- Der Microarray wird dreimal für je 5 min PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.
- Die Inkubation mit der Osteopontin- bzw. Collagen I-haltigen Probe bzw. den Negativkontrollen oder Proteingemischen erfolgt für 2 h mit 800 µl Lösung in PBS + 0,2% TopBlock bei 25°C.
- Es wird dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.
- Die Inkubation mit biotinylierten polyklonalen Antikörpern gegen Collagen I bzw. Osteopontin (2 µg/ml) in PBS + 0,2 % TopBlock erfolgt für 1,5 h bei 25°C.
- Der Microarray wird erneut dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.
- Es folgt die Inkubation mit 1,8 µg/ml Cy3-markiertem Streptavidin für 45 min bei 25°C.
- Abschließend werden die Slides im Druckluftstrom getrocknet.

---

<sup>6</sup>Dissertation von Solvig Diederichs, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

# 3. Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

In den folgenden Kapiteln werden zunächst unterschiedliche Faktoren geschildert, die zur Eignung einer Nitrocellulose-Membran als Substrat für Protein-Microarrays beitragen (Abschnitt 3.1). Diese Untersuchungen wurden zur Entwicklung von Membran-basierten Microarrays genutzt. Die entwickelten Microarrays werden genauer charakterisiert (Abschnitt 3.2) und ihre Einsetzbarkeit in verschiedenen Microarray-Applikationen wird demonstriert. Dabei werden insbesondere potentielle Anwendungsgebiete in der Biotechnologie beschrieben (Abschnitt 3.3). Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert, genaue Versuchsbeschreibungen sowie die Protokolle zur Anwendung der entwickelten Microarrays befinden sich in Kapitel 2 ab Seite 19.

## 3.1. Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

In der Protein-Microarray-Technologie ist die Auswahl einer geeigneten Microarray-Oberfläche ein entscheidender Faktor. Nitrocellulose weist dabei eine hohe Bindungskapazität auf und führt somit zu hohen Signalintensitäten und einem breiten dynamischen Bereich des Microarrays. Darüber hinaus bewirkt die raumstrukturierte Umgebung eine Stabilisierung der gespotteten Proteine. Ein Problem der heute kommerziell erhältlichen Nitrocellulose-Membranen stellt dabei - wie bereits in Abschnitt 1.6.3 beschrieben wurde - häufig die hohe Eigenfluoreszenz dar. [154, 48, 87, 86]

Um diesem Problem zu begegnen, wurden verschiedene Nitrocellulosemembranen der Firma Sartorius Stedim Biotech (Göttingen) untersucht. Dabei wurden Nitrocellulosemembranen unterschiedlicher Porengröße und Einfärbung sowie unterschiedlich dicke Membranschichten verwendet. Es wurde nach einem Substrat gesucht, das bei reduziertem Hintergrund zu guten Signalintensitäten und einer hohen Signalqualität führt.

Als Maß der Signalqualität wurde die *Signal to Noise Ratio* (SNR) berechnet. Sie berechnet sich aus der Signalintensität (*Signal Mean*, SM), der Hintergrundintensität (*Background Mean*, BM) und dem Rauschen des Hintergrundes (*Standarddeviation of Background*, Stdev. BG) nach der folgenden Formel:

$$SNR = \frac{SM - BM}{Stdev.BG}$$

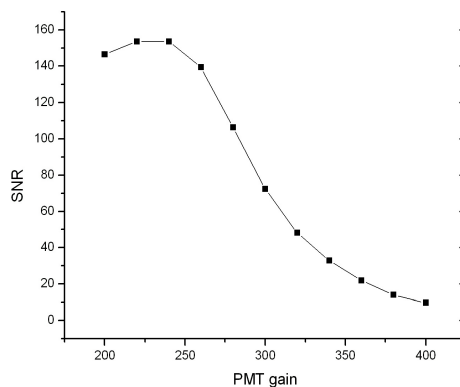


Abbildung 3.1.: Abhängigkeit der SNR vom PMT-Gain.

Die SNR gibt also an, wie hoch sich die relative Signalintensität (SM-BM) über das Hintergrundrauschen erhebt. In der vorliegenden Arbeit wird auch das Detektionslimit über die SNR definiert. Dabei wird diejenige Konzentration, die gerade noch zu einer  $SNR \geq 3$  führt als Detektionslimit angegeben. [164]

Die SNR ist dabei auch abhängig von den Scannereinstellungen. In Abbildung 3.1 ist die SNR in Abhängigkeit vom verwendeten PMT-Gain dargestellt. Dabei kann sich die maximale SNR ( $SNR_{Max}$ ) für verschiedene Materialien bei unterschiedlichen PMT-Einstellungen ergeben. Beim Vergleich verschiedener Materialien wurde daher die  $SNR_{Max}$  und das LOD Gain-optimiert ermittelt.

### 3.1.1. Einfluss der Befestigungsmethode

Eine Fixierung der Substrate für Protein-Microarrays auf festen Trägern ist notwendig, da beim Aufdrucken der Proteinlösung und bei der Fluoreszenzdetektion durch die verwendeten Spotter bzw. den Fluoreszenzscanner vorgegebene Formate einzuhalten sind. Dabei werden üblicherweise die Abmessungen von in der Mikroskopie gebräuchlichen Objektträgern verwendet. Darüber hinaus ist die Handhabung von auf Glas-Objektträgern fixierten Membranen deutlich einfacher. Durch die Verklebung der Membranen auf dem Glas-Träger wird jedoch häufig eine Veränderung der Membraneigenschaften verursacht.

In Abbildung 3.2 ist exemplarisch der Einfluss der Verklebung auf die Hintergrundfluoreszenz der Membran dargestellt. In diesem Fall wurde die Membran mit dem doppelseitigen medizinischen Klebeband arcare 7841 der Firma adhesive research auf einem Objektträger fixiert. Es wurde fluoreszenzmarkiertes Protein (Penta His Alexa Fluor<sup>®</sup>555 und 647) manuell auf die Membran gespottet und der Slide direkt nach dem Spotten und zusätzlich nach dem Blocken und Waschen gescannt. Nach dem Wasserkontakt kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Hintergrundfluoreszenz der Membran, der ohne Verklebung nicht beobachtet wurde. Als Ursache für die Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz der Membran wird daher eine Diffusion von Klebstoffbestandteilen (z.B. Lösemitteln) durch die poröse Membran vermutet. Darüber hinaus wurde eine Hydrophobisierung der Oberfläche beobachtet. Neben der Erhöhung des Hintergrundes und damit verbundenen Sensitivitätseinschränkungen des Assays können Auswirkungen von Klebstoffbestandteilen auf die

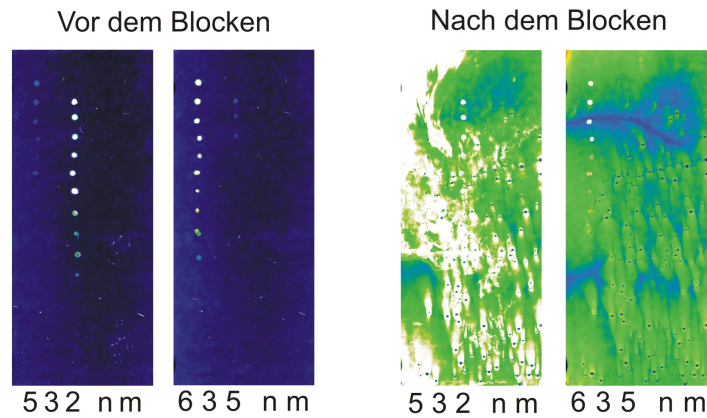


Abbildung 3.2.: Erhöhung des Hintergrundes der Membran durch Verwendung von medizinischen Tapes zur Befestigung der Membran auf dem Glas-Träger.

Funktionalität aufgedruckter Proteine nicht ausgeschlossen werden. Neben den Tapes wurden auch verschiedene Sprühkleber zur Fixierung der Membran auf dem Glas-Substrat getestet. Auch hier kam es zu einer Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz und der Hydrophobizität, darüber hinaus fand nach Wasserkontakt häufig eine Ablösung der Membran statt. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde am Institut für Technische Chemie eine Verklebungstechnik der Membranen entwickelt, die bei guter Wasserbeständigkeit zu niedrigen Hintergrundfluoreszenzen führt.<sup>1</sup> Da es sich hierbei jedoch um einen manuell durchgeführten, nur schwer zu reproduzierenden Prozess handelt, wurden zur Charakterisierung der unterschiedlichen Membranen zunächst lose Membranen eingesetzt, welche mit einem Magnetrahmen auf einem metallischen Träger der Größe eines Objektträgers fixiert wurden (siehe Abb. 2.3 auf Seite 21).

### 3.1.2. Einfluss der Porengröße

Durch die Sartorius Stedim Biotech (Göttingen) wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie ein deutlicher Anstieg der Proteinbindekapazität mit abnehmender Porengröße der Membran beobachtet.<sup>2</sup> Die Ursache dafür ist in einer Vergrößerung der inneren Oberfläche der Membran mit Verringerung der Porengröße bzw. abnehmender Porosität zu sehen. Entsprechend können mehr Proteinmoleküle pro Volumeneinheit an den Wänden der Poren adsorbiert werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Porengröße auf die Signalintensität im Microarray-Experiment wurde mouse IgG in unterschiedlichen Konzentrationen auf schwarze unverklebte Membranen gespottet. Als fluoreszenzmarkierter Interaktionspartner wurde Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG (1,7 µg/ml) verwendet. Die Membranen wurden in diesem Experiment mit einem Magnethalter fixiert. Es ist ein Anstieg der resultierenden Signalintensität mit abnehmender Porengröße zu beobachten. Da in diesem Experiment jedoch keine Sättigung der Membrankapazität erreicht wurde, kann die Erhöhung der Bindungskapazität durch abnehmende Porengröße nicht die alleini-

<sup>1</sup>Diplomarbeit von Gordien Redlich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Grundlegende Untersuchungen zu Protein Microarrays (2004)

<sup>2</sup>Masterarbeit von Inka Praulich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Methoden- und Materialentwicklung zur Beurteilung mikroporöser Proteinarrays (2005)

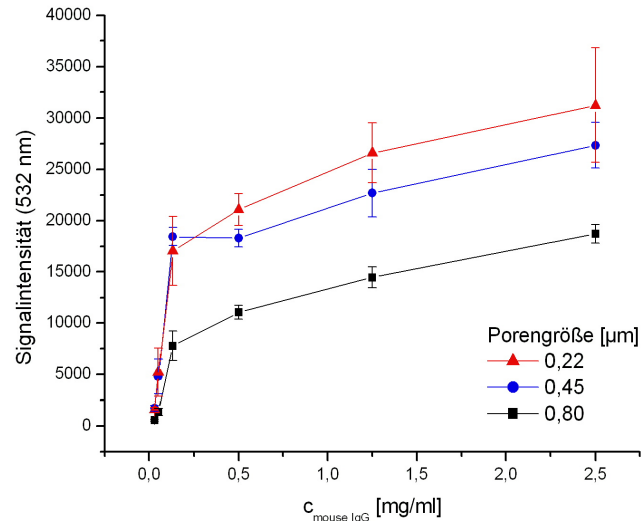


Abbildung 3.3.: Einfluss der Porengröße auf die Signalintensität im Microarray-Experiment.

ge Ursache für dieses Phänomen sein. Die Adsorption der Proteine in den hier betrachteten Membranen ist ein sehr komplexer Prozess. Neben der Bindungskapazität spielen auch andere Faktoren eine Rolle: So kann das Protein in Abhängigkeit von den Membraneigenschaften unterschiedlich tief in die dreidimensionale Struktur der Membran eindringen. Darüber hinaus verändert sich mit der Porosität der Membran auch das Ausmaß an Streulicht sowie die Spotgröße. Insgesamt scheint jedoch eine kleinere Porengröße nicht nur bezüglich der Membrankapazität sondern auch in Hinblick auf die resultierenden Signalintensitäten zu besseren Ergebnissen zu führen.

#### 3.1.3. Einfluss der Beschichtungsdicke

Wie bereits im Theorieteil dieser Arbeit (Abschnitt 1.6.3 auf Seite 16) beschrieben wurde, ist es bekannt, dass eine Verringerung der Beschichtungsdicke bei Nitrocellulosemembranen zu einer niedrigeren Autofluoreszenz und einer Verbesserung der Signalqualität führt. Im Rahmen der Masterarbeit von Inka Praulich wurde die Schichtdicke, die zum Signal beiträgt mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu 10 µm bestimmt. Jede Erhöhung der Membranstärke über dieses Maß hinaus führt lediglich zu einem höheren Hintergrund. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass der Hintergrund mit abnehmender Beschichtungsdicke abnimmt. Daraus resultieren höhere relative Signalintensitäten, die sich auch in höheren SNR-Werten niederschlagen.

#### 3.1.4. Einfluss der Membranfarbe

Bei den kommerziell erhältlichen auf weißer Nitrocellulose basierten FAST™ Slides gibt es in der Literatur immer wieder Hinweise auf eine hohe Eigenfluoreszenz der Membran, die mit der Fluoreszenz-Detektion von Bindungsereignissen interferiert. [154, 48, 87, 86] Neben



Tabelle 3.1.: Vergleich der schwarzen und weißen Membranen: Eigenfluoreszenzen sowie Signalintensitäten und SNR-Werte im Microarray-Experiment.

Membrantyp	Eigenfluoreszenz (532 nm)	Eigenfluoreszenz (635 nm)	Signalintensität (532 nm)	SNR (532 nm)
schwarz	3532	205	12122	34
weiß	31958	408	61378	9

den weißen Nitrocellulosemembranen stehen bei der Sartorius Stedim Biotech auch schwarze Nitrocellulose-Membranen zur Verfügung. Es wurden schwarze und weiße Membranen der Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$  getestet. Dazu wurden die Eigenfluoreszenzen der Membranen in den bei Microarray-Experimenten üblichen Cy3- und Cy5-Kanälen ermittelt. Dabei erwies sich die schwarze Membran vor allem im Cy3-Kanal (532 nm) als überlegen und wies im Vergleich zur weißen Membran eine um den Faktor 9 geringere Eigenfluoreszenz auf. Die Ursache für diese reduzierte Eigenfluoreszenz ist darin zu sehen, dass durch die Farbpartikel das eingestrahelte Licht in geringerem Maße reflektiert wird. Darüber hinaus wurden Experimente mit immobilisiertem mouse IgG (1 mg/ml) durchgeführt. Die Slides wurden nach dem Standardprotokoll (vgl. Abschnitt 2.3.2 auf Seite 24) geblockt und gewaschen und es wurden Bindungsstudien mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG (3,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Auf der weißen Membran ergeben sich höhere Signalintensitäten als auf der schwarzen Membran. Auch hier ist der Farbstoffanteil die Ursache für das geringere Signal: Zum einen wird bei der schwarzen Membran innerhalb des Spots gestreutes Licht nicht reflektiert sondern von den Farbstoffen absorbiert, zum anderen wird vermutet, dass der Farbstoff Signale, die in der Tiefe der Membran erzeugt werden, nicht mehr an die Oberfläche gelangen lässt. Aufgrund des wesentlich niedrigeren Hintergrundes ist jedoch die SNR als Maß der Qualität des Signals auf der schwarzen Membran wesentlich höher.

### 3.1.5. Optimiertes Microarray-Substrat

Die Untersuchung unterschiedlicher Nitrocellulosemembranen erbrachte die folgenden Ergebnisse:

- Eine geringe Membranstärke wirkt sich günstig auf die Eigenfluoreszenz aus.
- Niedrige Porengrößen führen zu erhöhten Signalintensitäten.
- Bei Fluoreszenz-Detektion wirkt sich eine Einfärbung der Membran positiv auf die Eigenfluoreszenz und die Signalqualität aus.
- Die Befestigung der Membran auf dem Glasträger ist ein kritischer Schritt und sollte nach Möglichkeit unter Verzicht auf Klebstoffe durchgeführt werden.

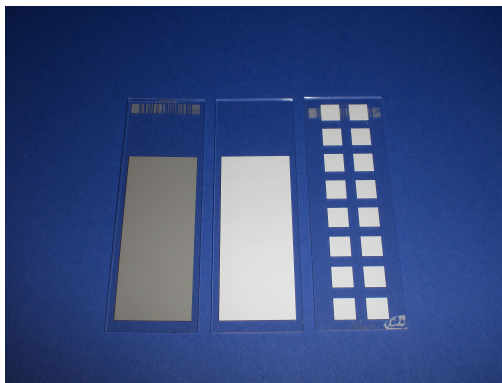


Abbildung 3.4.: Direkt beschichtete Microarray-Substrate. Links: schwarze Membran. Mitte: weiße Membran. Rechts: 16-Pad Slide.

Unter Berücksichtigung der hier dargestellten Ergebnisse und vorangegangenen Arbeiten<sup>345</sup> konnte die Sartorius Stedim Biotech ein Verfahren zur direkten Beschichtung von Glsträgern mit Nitrocellulose entwickeln. Dabei wird eine definierte Membranstärke erreicht. Die entwickelten Microarray-Substrate werden von der Sartorius Stedim Biotech inzwischen in Kooperation mit SCHOTT Jena<sup>er</sup> Glas GmbH vertrieben. Dabei wird sowohl ein auf schwarzer Nitrocellulose basierender Microarray, als auch ein weißes Nitrocellulose-Substrat angeboten (Abb. 3.4).

## 3.2. Charakterisierung der entwickelten Microarrays

Die entwickelten Membran-basierten Microarrays wurden bezüglich ihrer Eigenfluoreszenzen und der erreichbaren Detektionslimits charakterisiert. Dabei wurden sowohl schwarze als auch weiße Membranen (Sartorius Stedim Biotech) eingesetzt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden dazu die direkt beschichteten Microarrays verwendet. Zusätzlich wurden vergleichende Studien mit weiteren kommerziell erhältlichen Microarray-Substraten durchgeführt.

### 3.2.1. Schwarze Nitrocellulose

#### 3.2.1.1. Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein

Im Rahmen dieser Dissertation wird die folgende Nomenklatur verwendet: das immobilisierte Protein wird Capture-Protein genannt, das in Lösung befindliche Protein Target-Protein. In diesem Zusammenhang ist das Detektionslimit (*Limit of Detection*, LOD) des Target-Proteins ein entscheidendes Microarray-Charakteristikum zur Verwendung der Oberfläche in Forward Phase Assays. Um das Detektionslimit für das Target-Protein für die schwarzen Nitrocellulose zu bestimmen, wurde mouse IgG auf der schwarzen Membran in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 8 hits/dot gespottet. Dabei wurden die schwarzen Membranen

<sup>3</sup>Diplomarbeit von Gorden Redlich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Grundlegende Untersuchungen zu Protein Microarrays (2004)

<sup>4</sup>Masterarbeit von Inka Praulich, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Methoden- und Materialentwicklung zur Beurteilung mikroporöser Proteinarrays (2005)

<sup>5</sup>Diplomarbeit von Michael Reck, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Etablierung eines Sandwich-ELISA auf Proteinchip-Basis (2005)

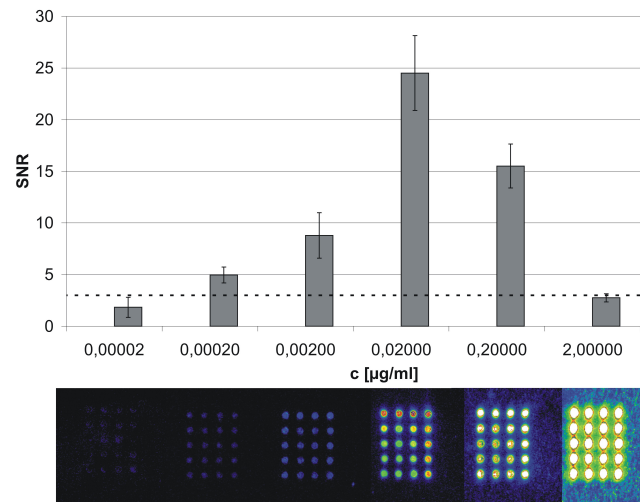


Abbildung 3.5.: SNR-Analyse für die schwarze Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar.

mit Schmelzklebefolie auf dem Glasträger fixiert (siehe Abschnitt 2.2.1 auf Seite 21). Nach dem Blockieren der Oberfläche wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti-mouse IgG für 18 h bei 25°C inkubiert. Dabei wurden Konzentrationen zwischen 2  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\text{pg/ml}$  untersucht. Die Scans sowie die resultierenden SNR-Werte sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Als Detektionslimit wurde die niedrigste Proteinkonzentration bestimmt, die zu einem Signal mit einer  $\text{SNR} \geq 3$  führt. [164]

Eine Konzentration des Detektionsantikörpers von 2  $\mu\text{g/ml}$  führt zu gesättigten Signalen und einem hohen Hintergrund. Diese beiden Faktoren führen zu einer niedrigen SNR von ca. 3. Mit einer Abnahme der Konzentration von Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG steigt die SNR zunächst an und durchläuft bei 20  $\text{ng/ml}$  ein Maximum. Als geringste Konzentration lässt sich 200  $\text{pg/ml}$  noch sicher nachweisen. Eine Immunantwort führt üblicherweise zu IgG-Konzentrationen von 10  $\text{ng/ml}$  bis zu 2  $\mu\text{g/ml}$ . [2] Das Detektionslimit der schwarzen Nitrocellulose ist also ausreichend, um die Immunantwort auf Infektionen zu beobachten.

Neben dem Detektionslimit ist auch die Konzentration an Detektionsantikörper interessant, die zu den höchsten SNR-Werten und somit zur besten Signalqualität führt. Diese Konzentration wurde im folgenden für alle Reversed Phase-Experimente verwendet.

### 3.2.1.2. Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein und Vergleich mit kommerziellen Microarrays

Im Reversed Phase Format stellt die Konzentration des gespotteten Proteins die unbekannteste Größe dar. Die Sensitivität des Assays wird in diesem Fall durch das Detektionslimit in Bezug auf das Capture-Protein bestimmt. Deshalb wurde die SNR und das Detektionslimit in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten mouse IgGs unter der Verwendung der in Abschnitt 3.2.1.1 bestimmten optimalen Konzentration des Target-Proteins (20  $\text{ng/ml}$  Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti-mouse IgG) bestimmt. Zusätzlich wurden Versuche mit diversen kommerziell erhältlichen Microarray-Substraten durchgeführt, um die Qualität der

schwarzen Nitrocellulose einschätzen zu können. Als zweidimensionale Substrate wurden Aldehyd-modifizierte Glas-Substrate (Schott Nexterion®Slide Al) und Aminosilan Slides (Schott Nexterion Slide A) eingesetzt. Als dreidimensionale Vergleichssubstrate wurden Path™ Slides (GenTel Biosciences), FAST™ Slides (Whatman) und Hydrogel-basierte Schott Nexterion®Slides H verwendet. Alle Substrate wurden in Bezug auf ihre Eigenfluoreszenz, den dynamischen Bereich sowie die Nachweisgrenze untersucht.

#### Eigenfluoreszenz

Die Eigenfluoreszenzen wurden für alle genannten Substrate unter Verwendung der gleichen Scanner-Einstellungen bei 532 nm gemessen. Dabei zeigt sich wie erwartet, dass die Eigenfluoreszenz der Glassubstrate und des Hydrogel-Slides im Vergleich zu den Nitrocellulose-basierten Microarrays gering ausfällt. Unter den Nitrocellulose basierten Microarrays ist die Eigenfluoreszenz des Path™ Slides am geringsten. Dieser Slide ist nach Herstellerangaben mit einem Nitrocellulose-Film einer Stärke von unter 1 µm beschichtet. Somit lässt sich die geringe Eigenfluoreszenz mit der geringen Schichtdicke der Nitrocellulose erklären. Der FAST™ Slide weist mit 33243 AU die höchste gemessene Eigenfluoreszenz auf, während die schwarze Nitrocellulose mit 1790 AU eine um den Faktor 19 geringere Eigenfluoreszenz aufweist (vgl. Scans in Abb. 3.6 und Tabelle 3.2)

#### Dynamischer Bereich

Im Bereich Proteomik werden Assay-Systeme mit einem breiten dynamischen Bereich benötigt, da sich der dynamische Bereich der Proteinkonzentrationen im biologischen System bei Eukaryoten um den Faktor  $10^5$  und in Serum sogar um den Faktor  $10^{10}$  unterscheiden kann. [121] Um den dynamischen Bereich der unterschiedlichen Substrate abschätzen zu können, wurde eine Analyse der relativen Signalintensität (*Signal Mean-Background Mean*, SM-BM) in Abhängigkeit von der Konzentration des Capture-Antikörpers durchgeführt (Abb. 3.7). Dabei zeigte die schwarze Nitrocellulose die höchste relative Signalintensität (bis zu 28210 AU), gefolgt vom Fast™ Slide (20361 AU) und dem Path™ Slide (21285 AU). Für den Aldehyd-modifizierten Microarray und in geringerem Ausmaß auch für den Aminosilan- und den Hydrogel-Slide wurde eine Sättigung der Signalintensitäten bei Konzentrationen über 0,125 mg/ml beobachtet. Auf dem Aldehyd-Slide ist diese Sättigung der Membrankapazität bei hohen gespotteten Konzentrationen auch im Scan zu erkennen: Nicht-gebundenes Protein wurde abgewaschen und führte zur Ausbildung so genannter Kometen-Schweife (siehe Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu weisen die Nitrocellulose-basierten Microarrays (schwarze Nitrocellulose, FAST™ Slide, Path™ Slide) einen breiteren dynamischen Bereich auf.

#### Detektionslimit

Um das Detektionslimit für das Capture-Protein zu bestimmen, wurde für alle Substrate eine Analyse der SNR in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Proteins durchgeführt (Abb. 3.7 b). Die höchste SNR wurde auf dem Hydrogel-Slide ( $SNR_{\text{Max}}=489$ ) beobachtet. Auch die planaren Oberflächen sowie der Path™ Slide wiesen hohe SNR-Werte auf. Die schwarze Nitrocellulose weist mit einer  $SNR_{\text{max}}$  von 76 eine etwas höhere SNR auf als der FAST™ Slide ( $SNR_{\text{Max}}=66$ ). Wesentlich für die Nachweisgrenze ist jedoch

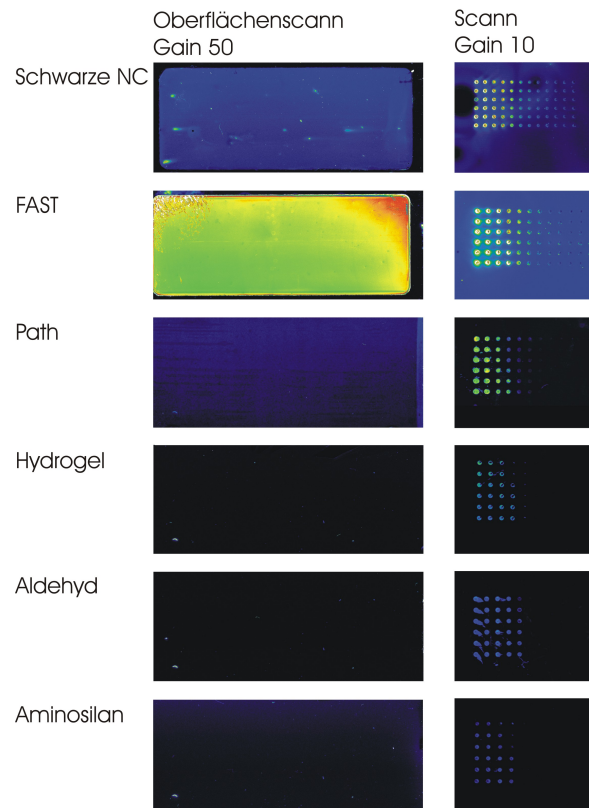
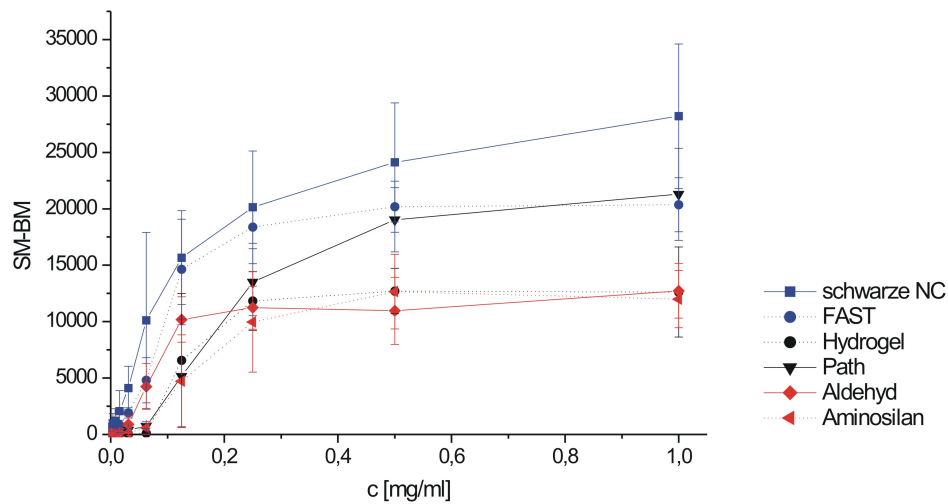


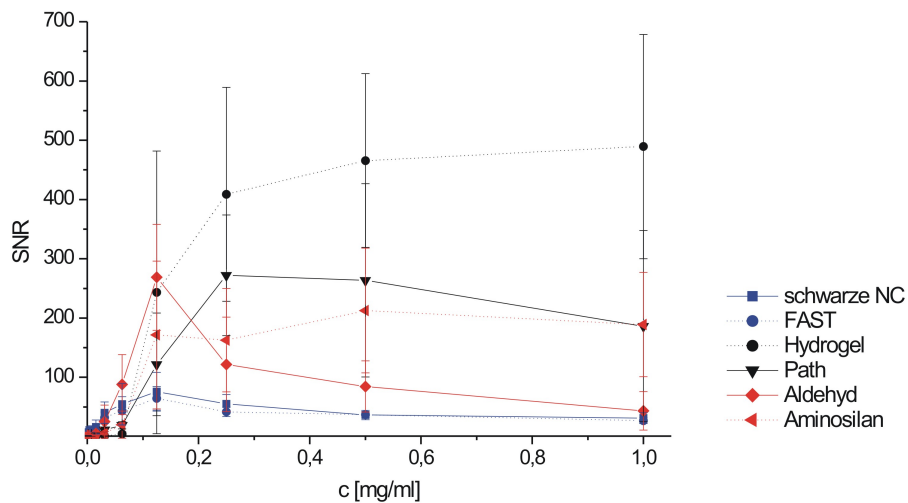
Abbildung 3.6.: Oberflächen-scans der untersuchten Microarray-Substrate vor (links) und nach dem Microarray-Experiment.

nicht die maximal erreichbare SNR, sondern die SNR bei geringen Konzentrationen. Als Detektionslimit wurde auch hier die niedrigste Proteinkonzentration bestimmt, die zu einem Signal mit einer SNR größer als 3 führt. [164] Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Hier zeigt sich die Überlegenheit der schwarzen Nitrocellulose: Während bei Konzentrationen unter  $7,8 \mu\text{g/ml}$  die SNR für fast alle getesteten Substrate unter 3 fällt, sind auf der schwarzen Nitrocellulose auch Konzentrationen von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  noch sicher nachzuweisen. Auch Madoz-Gurpide et al. (2001) untersuchten die Bindungseigenschaften von Amino- und Aldehyd-modifizierten Microarrayoberflächen und verglichen sie mit Nitrocellulose-basierten FAST<sup>TM</sup> Slides. Dabei beobachteten sie, dass beim FAST<sup>TM</sup> Slide auch Protein-Konzentrationen detektiert werden konnten, die auf den zweidimensionalen Substraten nicht nachweisbar waren. Die Sensitivität des Nitrocellulose-Slides war also auch hier höher. [100] Aufgrund des niedrigen Detektionslimits und des breiten dynamischen Bereiches bietet sich die schwarze Nitrocellulose als Material für Reversed Phase Assays an. Die hier dargestellten herausragenden Eigenschaften der schwarzen Nitrocellulose wurden bereits veröffentlicht. [66]

### 3. Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays



(a) Analyse der relativen Signalintensität.



(b) SNR-Analyse.

Abbildung 3.7.: Analyse der relativen Signalintensität und der SNR für unterschiedliche Substrate in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Proteins.

Tabelle 3.2.: Vergleich der Eigenfluoreszenzen, der maximal erreichten SNR-Werte sowie des Detektionslimits (LOD) für unterschiedliche Substrate.

Substrat	Autofluoreszenz [AU]	SNR <sub>Max</sub>	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]
schwarze NC	1790	76	0,5
FAST <sup>TM</sup>	33243	66	6,2
Path <sup>TM</sup>	1181	272	12,5
Hydrogel	219	489	50,0
Aldehyd	597	269	12,5
Aminosilan	125	213	25

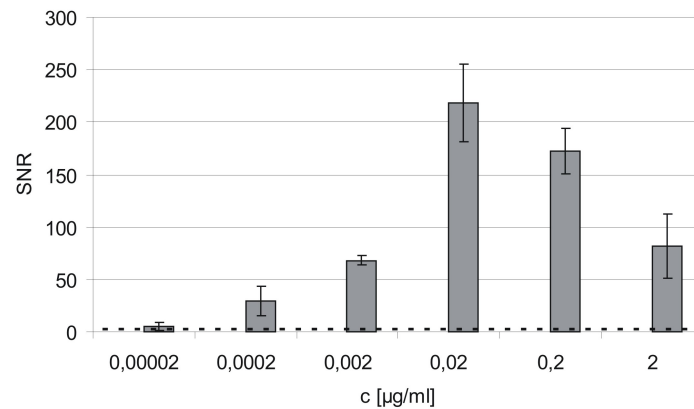


Abbildung 3.8.: SNR-Analyse für die weiße Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar.

### 3.2.2. Weiße Nitrocellulose

#### 3.2.2.1. Bestimmung des Detektionslimits für das Target-Protein

Zur Bestimmung des Detektionslimits in Bezug auf das Target-Protein für die weiße Membran wurde ebenso vorgegangen, wie bei der schwarzen Membran (vgl. Abschnitt 3.2.1.1 auf Seite 40). Dabei wurde wiederum die SNR in Abhängigkeit von der Konzentration des Target-Proteins untersucht. Die SNR-Analyse ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Auf der weißen Membran konnten noch Konzentrationen von 20  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden. Als optimale Konzentration des fluoreszenzmarkierten Targetproteins wurde auch für die weiße Membran 20  $\text{ng/ml}$  bestimmt.

#### 3.2.2.2. Bestimmung des Detektionslimits für das Capture-Protein

Auch für die weiße Membran wurde das für Reversed Phase Experimente wesentliche Detektionslimit für das Capture-Protein bestimmt. Dabei wurde ebenso wie unter Abschnitt 3.2.1.2 für die schwarze Membran beschrieben vorgegangen. Auch auf der weißen Membran kann eine Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  mouse IgG nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

#### 3.2.2.3. Vergleich mit anderen Microarray-Oberflächen

Die weiße Nitrocellulose wurde mit kommerziell erhältlichen Microarray-Oberflächen verglichen. Dabei wurden die ebenfalls Nitrocellulose-basierten FAST<sup>TM</sup> und Path<sup>TM</sup> Slides verwendet. Darüber hinaus wurden vergleichende Untersuchungen unter Verwendung unterschiedlicher Drucker und Spotting-Puffer durchgeführt.

#### 3.2.2.4. Vergleich unterschiedlicher Spottingparameter

Bei der Spotting Technologie unterscheidet man im wesentlichen zwischen Kontaktdruckern und kontaktfreien Druckern. Beim Kontaktdrucker wird durch eine dünne Nadel ein definiertes Volumen direkt auf die Oberfläche übertragen. [160] Ein Nachteil dieser Technologie

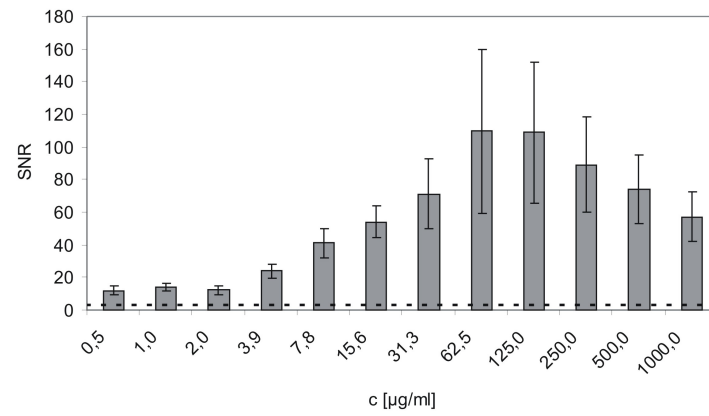


Abbildung 3.9.: SNR-Analyse für die weiße Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Antikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar.

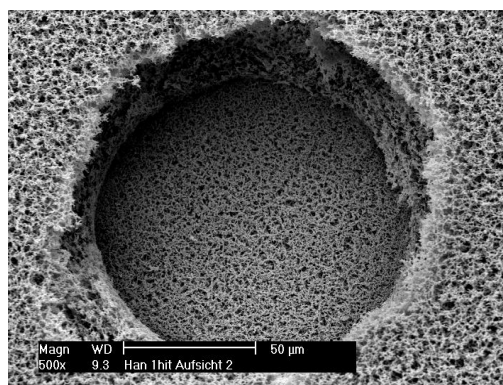


Abbildung 3.10.: REM-Aufnahme eines Spots, der mit dem Kontaktdrucker (Pin und Ring) gedruckt wurde. Quelle: Markus Hollas, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.



ist - vor allem bei Verwendung raumstrukturierter Microarray-Substrate - die Beschädigung der Oberfläche. Eine solche Beschädigung der Membran durch den am Institut für Technische Chemie vorhandenen Kontaktdrucker ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Bei dem Affymetrix 417<sup>TM</sup> Arrayer kann die Pintiefe beim Drucken lediglich in 100 µm Schritten justiert werden. Dadurch ist eine Beschädigung der Membran beim Spotten nicht zu vermeiden. Kontaktdrucker werden von manchen Arbeitsgruppen für generell ungeeignet zum Spotten von Proteinen gehalten. Ein Argument ist dabei, dass der Kontakt zwischen dem metallischen Pin und der festen Microarray-Oberfläche zur Denaturierung der Proteine führen kann. Es wird angenommen, dass bei Verwendung von kontaktfreien Drucksystemen die mechanische Belastung des Proteins geringer ist. [145] Beim kontaktfreien Drucken hat sich mit den Piezo-Drucken im wesentlichen die Ink Jet Technologie durchgesetzt. [136] Hier besteht die Gefahr, dass durch die während des Druckens auftretenden Scherkräfte empfindliche Proteine geschädigt werden.

Bei der Auswahl der Spotting-Technologie müssen verschiedene Parameter, wie z.B. der Probenotyp, die Oberflächenbeschaffenheit und das Ausmaß an notwendigem Probendurchsatz berücksichtigt werden. So gibt es Vermutungen, dass zur Verwendung von Membranbasierten Microarray-Substraten der Einsatz eines kontaktfreien Druckers von Vorteil ist. [105] Dem Vorteil des beschädigungsfreien Druckens stehen jedoch höhere Kosten gegenüber. Darüber hinaus sind Nicht-Kontakt-Drucker häufig wartungsintensiver, da die verwendeten Kapillaren verstopfen können, während Kontaktdrucker mit massiven Pins robust und leicht zu reinigen sind. Als Richtlinie gilt hier, dass Nicht-Kontakt-Drucker zu bevorzugen sind, wenn die Zahl der zu spottenden Proben gering ist und die Anzahl der Druckwiederholungen hoch. [105] Auch die verwendeten Puffer spielen beim Spotten eine entscheidende Rolle. Dabei können Zusätze verwendet werden, die sich stabilisierend auf das gespottete Protein auswirken. Auch sollten die verwendeten Microarray-Oberfläche und der Spottingpuffer aufeinander abgestimmt werden. Dabei spielt vor allem die Hydrophobizität der Oberfläche eine entscheidende Rolle. So berichten Schaeferling et al. (2002), dass eine hoch hydrophobe Oberfläche in Kombination mit Spottingpuffern, die über eine geringe Oberflächenspannung verfügen, zu großen Spots führt. Allgemein wird berichtet, dass sehr hydrophobe Oberflächen zu Inhomogenitäten in der Spotmorphologie und den resultierenden Signalen führen. [145] Der Puffer kann die Proteinbindungskapazität der Oberfläche, die Stabilität der Proteine sowie die Spot-Qualität beeinflussen. [87] Vor allem hydrophobe Oberflächen können zur Denaturierung von Proteinen führen. Als protektive Substanzen können Glycerol, Disaccharide wie Trehalose oder auch Polyethylenglycol (PEG) dem Spottingpuffer zugesetzt werden. [86] PBS + 0,5% Trehalose wurde von Kusnezow et al. (2003) als optimaler Spottingpuffer bestimmt und wurde im Rahmen dieser Dissertation als Standard-Spottingpuffer verwendet. [87]

Es wurde eine umfassende vergleichende Studie für die Nitrocellulose-basierten Microarray-Oberflächen (weiße Nitrocellulose, FAST<sup>TM</sup> und Path<sup>TM</sup> Slide) unter Verwendung eines Kontaktdruckers und eines kontaktfreien Druckers durchgeführt. Die Versuche wurden von Claas Haake im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.<sup>6</sup> Das Spotten der Microarrays mit dem kontaktfreien Drucker wurde dabei freundlicherweise von Dr. Uwe Andag bei der

<sup>6</sup>Diplomarbeit von Claas Haake, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

Sartorius Stedim Biotech unter Verwendung des sciFLEXARRAYER S3 durchgeführt. Dabei wurden je Spot Volumina von 500 pl (sciFLEXARRAYER S3) bzw. 800 pl (Affymetrix 417<sup>TM</sup> Arrayer) aufgetragen und es wurden die folgenden Spottingpuffer getestet:

- PBS + 0,5% Trehalose
- PBS + 0,5% SDS
- PBS + 0,01% BSA
- Next Spot BP (kommerziell erhältlicher Spotting-Puffer von SCHOTT)

Die Scans der Microarrays sind in Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 dargestellt. Die maximal erreichten SNR-Werte sowie die Detektionslimits in Bezug auf das Capture-Protein sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 zusammengefasst. Beim Vergleich der unterschiedlichen Oberflächen, Spottingpuffer und Drucktechniken lassen sich für die unterschiedlichen Microarray-Substrate folgende Schlüsse ziehen:

#### **Path<sup>TM</sup> Slide**

Für den Path<sup>TM</sup> Slide wird bei Verwendung des Kontaktdruckers eine Sättigung der Membran bei höheren mouse IgG Konzentrationen beobachtet. Hier bilden sich typische Kometenschweife, die darauf hindeuten, dass nicht die gesamte gespottete Proteinmenge immobilisiert wurde, sondern sich ein Teil des Proteins während des Blockierens und Waschens des Microarrays ablöst. Dieser Effekt tritt allerdings bei Verwendung von PBS + 0,5% SDS als Spotting-Puffer nicht auf. Dieser Puffer liefert auf den Path<sup>TM</sup> Slide unter Verwendung des Kontaktdruckers auch die niedrigsten Nachweisgrenzen und höchsten maximalen SNR-Werte.

Unter Verwendung des kontaktfreien Druckers werden für PBS + 0,5% Trehalose und PBS + 0,01% BSA ebenfalls eine Sättigung der Membran beobachtet. Dieser Effekt blieb jedoch bei Verwendung des kommerziellen Spotting-Puffers Next Spot BP aus. Dieser Puffer lieferte auch in Bezug auf die LOD und die SNR<sub>Max</sub> die besten Ergebnisse. Der SDS-haltige Spotting-Puffer führt zu sehr großen verlaufenen Spots. Allgemein fällt auf, dass es bei Verwendung des kontaktfreien Druckers in Verbindung mit dem Path<sup>TM</sup> Slide zu einem unpräzisen Spotten kommt. So sind die Positionen der Spots nicht exakt definiert, möglicherweise führen elektrostatische Effekte zu einer Ablenkung der Flüssigkeitstropfen an der Oberfläche.

#### **FAST<sup>TM</sup> Slide**

Bei Verwendung des Kontaktdruckers kommt es beim FAST<sup>TM</sup> Slide - ebenso wie beim weißen Nitrocellulose-Slide - durch die Beschädigung der Membran während des Druckens zu einer Donut-Struktur der Spots. Auf dem FAST<sup>TM</sup> Slide werden sowohl unter Verwendung des Kontaktdruckers als auch unter Verwendung des kontaktfreien Druckers die besten LOD und SNR<sub>Max</sub>-Werte unter Verwendung des Next Spot BP erreicht. Dabei sind die erreichten maximalen SNR Werte bei Verwendung des kontaktfreien Druckers mit SNR<sub>Max</sub>=425 wesentlich höher als bei Verwendung des Kontaktdruckers (SNR<sub>Max</sub>=200). Die Ursache für dieses Ergebnis ist in der Spotmorphologie zu sehen. In die Berechnung

der SNR geht die Signalintensität (SM) ein (siehe Seite 35). Diese wird von der Auswertesoftware (ImaGene<sup>TM</sup>) über den gesamten Spot gemittelt. Dabei werden bei Donut-Spots auch die Pixel niedriger Intensität im Inneren des Spots berücksichtigt. Da es beim kontaktfreien Drucken nicht zu Donut-Spots kommt, ergibt sich hier eine höhere SNR.

Auffällig sind die schlechten Ergebnisse, die sich für den SDS-haltigen Spotting-Puffer unter Verwendung des kontaktfreien Druckers auf den porösen Membran-Substraten ergeben (FAST<sup>TM</sup>, weiße NC, schwarze NC). Hier ergeben sich vor allem auf dem FAST<sup>TM</sup> Slide sehr große Spots und auf allen Membran-Substraten führt lediglich die höchste gespottete Konzentration (1 mg/ml) an mouse IgG zu deutlichen Signalen. Daraus resultieren auch hohe Werte für die LOD. Die Ursache für die großen Spots ist vermutlich, dass das Detergenz SDS die Oberflächenspannung der zu spottenden Proteinlösung herabgesetzt, wodurch sich das gespottete Volumen direkt nach dem Spotten auf der Membran ausbreitet. Dieser Effekt ist bei Verwendung des Kontaktdruckers nicht so stark ausgeprägt. Hier wird das gespottete Volumen (800 pl) nicht auf einmal, sondern in 8 Portionen von je 100 pl auf die Membran aufgetragen, während bei Verwendung des kontaktfreien Druckers ein Tropfen von 500 pl gespottet wird. Dadurch breiten sich die Spots, die mit dem Kontaktdrucker gesetzt werden, weniger stark aus. Ebenso lässt sich das hohe Detektionslimit für den SDS-Puffer unter Verwendung des kontaktfreien Druckers erklären: Das aufgetragene Volumen breitet sich aufgrund der geringeren Oberflächenspannung nicht nur an der Membranoberfläche rascher aus, sondern dringt auch tiefer in die Membran ein. Insgesamt ergibt sich daraus eine Verminderung der Signalintensität, da sich die Proteinmenge über ein größeres Volumen verteilt. Darüber hinaus tragen Proteine, die tief in der Membran gebunden werden, weniger zur Signalintensität bei (vgl. Abschnitt 3.1.3 auf Seite 38).

#### **Weißer NC**

Auf der weißen NC ergeben sich die besten Werte für die LOD und die maximale SNR bei Verwendung des Kontaktdruckers mit dem Next Spot BP, bei Verwendung des kontaktfreien Puffers ergeben sich die besten Ergebnisse bei Verwendung des BSA-haltigen Spotting-Puffers. Allgemein fällt auf, dass der im Rahmen dieser Dissertation als Standardpuffer verwendete Puffer (PBS + 0,5% Trehalose) zu unerwartet schlechten Ergebnissen führt. So konnten bisher auch 0,5 µg/ml noch sicher nachgewiesen werden (siehe z.B. Abb. 3.9), während hier unter Verwendung des selben Spotters und des selben Puffers nur noch 15,6 µg/ml nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Ursache besteht hier in der unterschiedlichen Inkubationszeit der Microarrays nach dem Drucken. Während nach dem Standardprotokoll lediglich für 15 min inkubiert wird, wurde im Rahmen der Studie zum Einfluss des Druckers und des Spottingpuffers für 24 h inkubiert. Möglicherweise hat in dieser Zeitspanne bereits eine Denaturierung des Proteins stattgefunden.

#### **Schwarze NC**

Die schwarze Nitrocellulose-Membran wurde nur unter Verwendung des kontaktfreien Druckers eingesetzt. Die besten Ergebnisse wurden dabei unter Verwendung des Next Spot BP erzielt. Dabei konnten im Vergleich zur weißen NC wesentlich höhere Werte für SNR<sub>Max</sub> (907 vs. 515) sowie niedrigere Detektionslimits (1 µg/ml vs. 15,6 µg/ml) erreicht werden.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

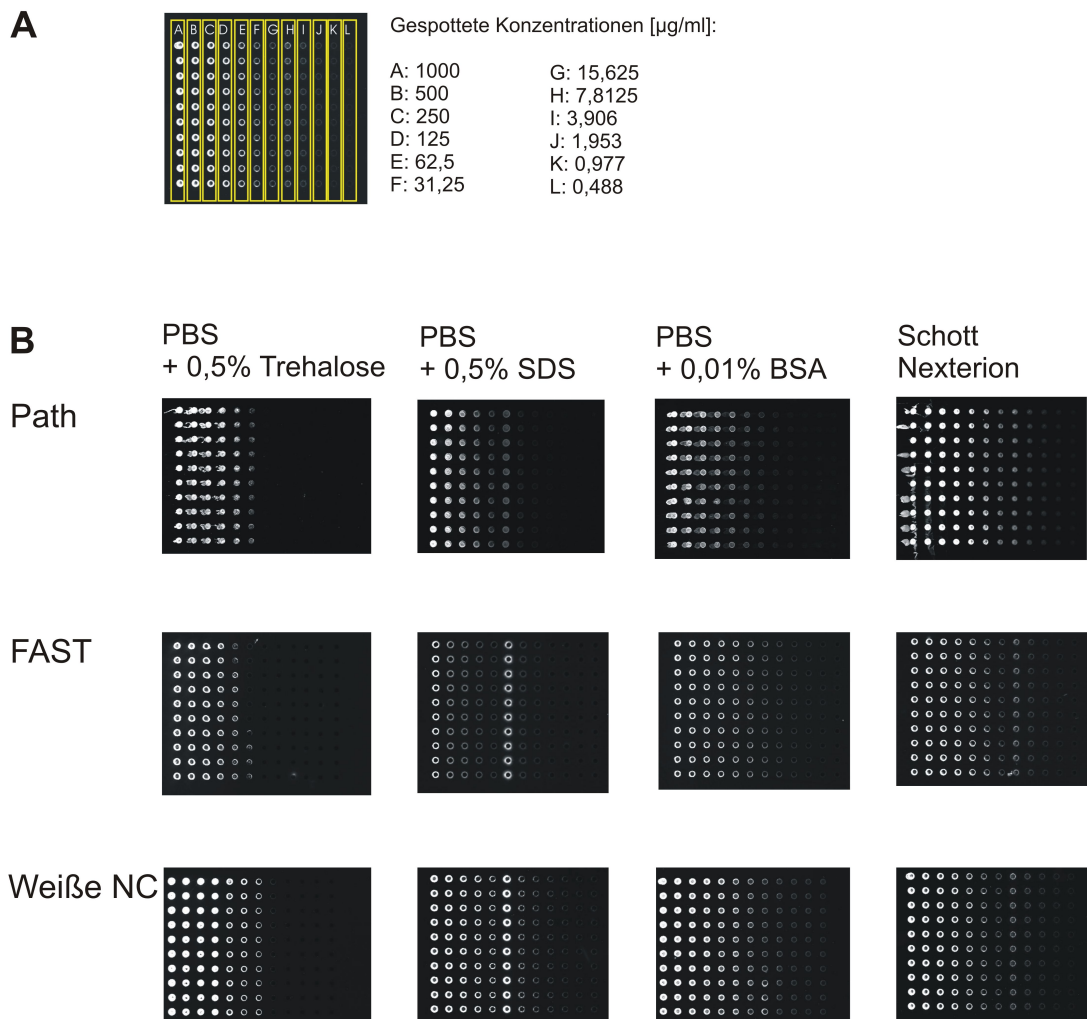


Abbildung 3.11.: Spottingschema (A) und Scans (B) der unterschiedlichen Microarray-Substrate die mit dem Kontaktdrucker gespottet wurden. Bei Verwendung von PBS + 0,5% SDS als Spottingpuffer lag bei der Konzentration F (31,25  $\mu\text{g/ml}$ ) vermutlich ein Pipettierfehler vor. Diese Konzentration wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die bereits geschilderten Vorteile der schwarzen NC bei Verwendung von Fluoreszenzdetektion konnten also auch im Rahmen dieser Studie bestätigt werden.

Eine allgemein gültige Empfehlung in Bezug auf den zu verwendenden Spotting-Puffer kann nicht gegeben werden. Es kommt hier zu einer komplexen Wechselwirkung zwischen Microarray-Substrat, dem verwendeten Spotting-Puffer und der Druck-Technik. Der optimale Spottingpuffer sollte für jede Oberfläche unter Berücksichtigung der verwendeten Drucktechnik empirisch bestimmt werden.

Tabelle 3.3.: Vergleich unterschiedlicher Oberflächen und Spottingpuffer bei Verwendung eines Kontaktdruckers.

Oberfläche	Spottingpuffer	SNR <sub>Max</sub>	LOD	Anmerkungen
Path <sup>TM</sup>	PBS + 0,5% Trehalose	123	15,6	bei hohen Konzentrationen verschmierte Spots
	PBS + 0,5% SDS	216	2	
	PBS + 0,01% BSA	100	0,5	bei hohen Konzentrationen verschmierte Spots
	Next Spot PB	227	0,5	bei hohen Konzentrationen verschmierte Spots
FAST <sup>TM</sup>	PBS + 0,5% Trehalose	96	31,2	
	PBS + 0,5% SDS	20	15,6	
	PBS + 0,01% BSA	137	4	
	Next Spot PB	200	2	
Weiße NC	PBS + 0,5% Trehalose	159	15,6	
	PBS + 0,5% SDS	263	15,6	
	PBS + 0,01% BSA	276	0,5	
	Next Spot PB	328	0,5	

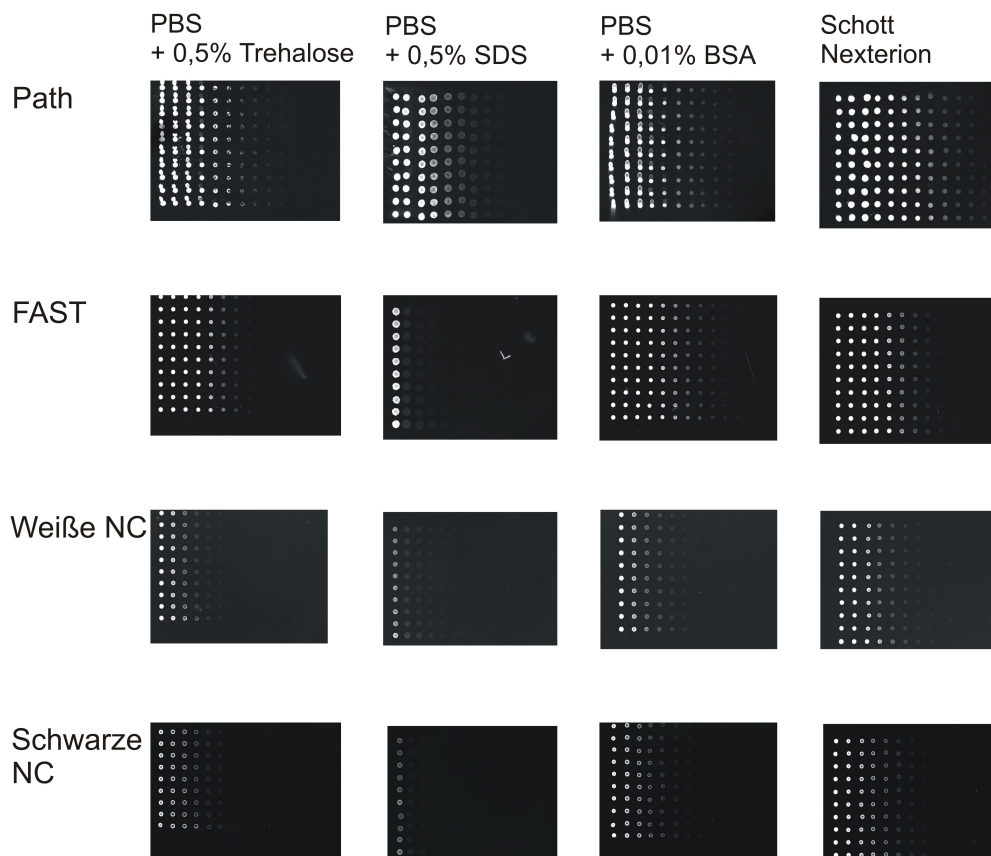


Abbildung 3.12.: Scans der unterschiedlichen Microarray-Substrate die mit dem kontaktfreien Drucker gespottet wurden. Das Spottingmuster entspricht dem in Abbildung 3.11 beschriebenen.

Tabelle 3.4.: Vergleich unterschiedlicher Oberflächen und Spottingpuffer bei Verwendung eines kontaktfreien Druckers.

Oberfläche	Spottingpuffer	SNR <sub>Max</sub>	LOD	Anmerkungen
Path <sup>TM</sup>	PBS + 0,5% Trehalose	73	4	bei hohen Konzentrationen verschmierte Spots
	PBS + 0,5% SDS	28	7,8	sehr große verlaufene Spots
	PBS + 0,01% BSA	65	2	bei hohen Konzentrationen verschmierte Spots
FAST <sup>TM</sup>	Next Spot PB	146	0,5	
	PBS + 0,5% Trehalose	674	2	
	PBS + 0,5% SDS	8	1000	sehr große verlaufene Spots
	PBS + 0,01% BSA	386	0,5	
Weiße NC	Next Spot PB	425	1	
	PBS + 0,5% Trehalose	336	15,6	
	PBS + 0,5% SDS	96	31,25	
	PBS + 0,01% BSA	224	7,8	
	Next Spot PB	515	15,6	
Schwarze NC	PBS + 0,5% Trehalose	461	4	
	PBS + 0,5% SDS	100	62,5	
	PBS + 0,01% BSA	597	2	
	Next Spot PB	907	1	

### 3.3. Anwendung der Membran-basierten Microarrays

Im Folgenden werden einige mögliche Anwendungen der entwickelten Microarray-Substrate dargestellt. Dabei werden sowohl Forward Phase Assays und Reversed Phase Assays als auch unterschiedlich komplexe Sandwich Systeme verwendet. Darüber hinaus wird die Anwendbarkeit der Systeme anhand von realen Beispielen aus der Biotechnologie demonstriert. So erfolgt die Detektion von Proteinen in komplexen biologischen Proben und es werden Möglichkeiten zur Quantifizierung von Proteinen im Microarray-Format vorgestellt.

#### 3.3.1. Forward Phase Assays

Bei Forward Phase Assays wird ein Fängermolekül - üblicherweise ein Antikörper - auf dem Microarray-Substrat immobilisiert und zum Nachweis des fluoreszenzmarkierten Target-Proteins verwendet. Dieser Microarray-Typ bietet sich vor allem zur Interaktions-Analyse an.

##### 3.3.1.1. Detektion His-getaggtter Proteine

Es wurde ein Microarray zur Detektion His-getaggtter Proteine entwickelt. Dazu wurde die schwarze Nitrocellulose verwendet, auf der ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper gespottet wurde. Der Microarray wurde nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 24) bearbeitet und als Interaktionspartner wurde His-getaggtte mit Cy3 markierte  $\beta$ -Glucanase (Bgl-His) verwendet. Dieser Microarray konnte erfolgreich zur Bewertung der Labeling-Güte von His-Tag Proteinen eingesetzt werden. Dazu wurde Cy3-markiertes Bgl-His, das unter verschiedenen Bedingungen gelabelt wurde, auf den Microarrays inkubiert. Die Bewertung erfolgte dabei auf Basis der erhaltenen Signalintensitäten und der SNR in Abhängigkeit von dem Verhältnis zwischen Farbstoff und Protein. Die Versuche zum Labeling sowie die Optimierung des Labelings sind in Teil 2 dieser Arbeit in Abschnitt 2.1.1.3 dargestellt.

Die mit Antikörpern gegen den His-Tag bedruckten Microarrays wurden auch erfolgreich zur Detektion weiterer His-getaggtter Proteine eingesetzt. So konnte auch *Pseudomonas fluorescens* Esterase I (PFEI-His) nachgewiesen werden. Unter Verwendung von Cy3-markiertem PFEI-His (1  $\mu$ g/ml) wurde die Stabilität der Antikörper auf dem Microarray-Substrat über einen Zeitraum von 16 Tagen beobachtet. Dabei wurde neben der weißen Nitrocellulose auch GAPS- und Aldehyd-modifizierte Glassubstrate verwendet, um zu überprüfen, ob die Verwendung der dreidimensionalen Nitrocellulose-Membran tatsächlich zu einer Erhöhung der Stabilität von immobilisierten Antikörpern führt. Auch auf der Nitrocellulosemembran konnte dabei eine Abnahme der erreichten Signalintensität beobachtet werden. Nach 16-tägiger Lagerung der bedruckten Microarrays bei Raumtemperatur konnten nur noch 64% der Signalintensität die direkt nach dem Spotten erreicht wurde gemessen werden. Es scheint also bereits nach 16 Tagen zu einem signifikanten Verlust an Aktivität des immobilisierten Antikörpers zu kommen. Allerdings fällt dieser Verlust an Aktivität bei Verwendung der Nitrocellulose-Microarrays deutlich niedriger aus als bei Verwendung

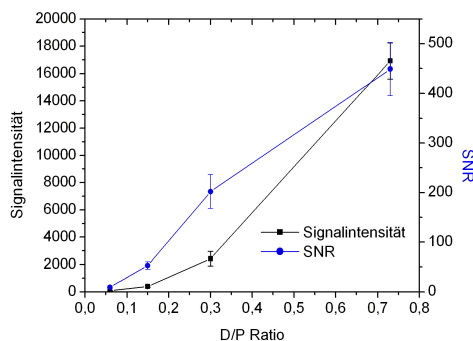


Abbildung 3.13.: Anwendung des Forward Phase Microarrays zur Beurteilung der Labeling-Güte von Cy3-markiertem Bgl-His.

Tabelle 3.5.: Verlauf der Signalintensität im Microarray-Experiment nach 16 Tagen in Abhängigkeit vom Microarray-Substrat.

Substrat	weiße NC	GAPS	Aldehyd
SM [%]	64 ± 11	28 ± 17	16 ± 6

von Glas-Substraten (Tabelle 3.5). Die stabilisierende Wirkung der raumstrukturierten Nitrocellulose konnte also bestätigt werden.

### 3.3.1.2. Versuche zum Multiplexing im Forward Phase Format

Im Forward Phase Experiment ist es durch Spotten unterschiedlicher Fängermoleküle auf einem Microarray möglich, mehrere Proteine in einer Probe nebeneinander nachzuweisen. Darüber hinaus können Zweifarben-Experimente durchgeführt werden, die z.B. die Untersuchung von zwei verschiedenen, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben auf einem Microarray ermöglichen. Das Multiplexing kann also auf Ebene des Capture-Proteins oder des Target-Proteins durchgeführt werden. Um beide Ansätze zu simulieren und die Eignung der Nitrocellulosemembran für Multiplex- und Zweifarben-Experimente zu überprüfen, wurde folgendes experimentelles Vorgehen gewählt: Auf die Nitrocellulose wurden His-Tag  $\beta$ -Glucanase (Bgl-His), ein Antikörper gegen Streptavidin und mouse IgG als Fängermoleküle jeweils in einer Konzentration von 1 mg/ml gespotet. Als Negativ-Kontrollen wurden BSA sowie Fötale Kälberserum (FCS) verwendet. Zusätzlich wurde eine Spalte mit nicht beladenem Pin als Negativ-Kontrolle gedruckt.

Die so vorbereiteten Microarrays wurden nach dem Standardprotokoll bearbeitet und es wurden Bindungsstudien mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Proteinen und Proteingemischen durchgeführt. Dazu wurden als spezifische Bindungspartner Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG (20 ng/ml), Cy5-markiertes Streptavidin (1  $\mu$ g/ml) und Alexa Fluor<sup>®</sup>555 Penta His Antikörper (3,33  $\mu$ g/ml) verwendet. Zunächst wurden Einfarben-Experimente durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Zweifarben-Experiment mit einer Mischung aus Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG und Cy5-markiertem Streptavidin durchgeführt. Zur Bewertung der Spezifität der immobilisierten Fängermoleküle und zur Simulation komplexer Proben wurden zusätzlich Versuche mit humanem Serum (1,5  $\mu$ g/ml) durchgeführt, welches mit dem Cy5 Mono-Reaktive Dye (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben markiert



Tabelle 3.6.: SNR-Analyse der mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Proteinen und Proteingemischen inkubierten Microarrays im Cy3 Kanal (532 nm). Korrekt positive Signale wurden grün hervorgehoben.

Inkubation mit:	Bgl-His	anti-Streptavidin	mouse IgG	BSA	FCS	Blank
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG	-1,9	-1,0	<b>16,7</b>	2,8	1,1	-3,4
Streptavidin Cy5	-3,0	-1,7	-2,4	-1,7	-0,8	-5,3
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 Penta His	<b>54,3</b>	-2,6	-2,7	-2,6	-2,1	-5,4
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG + Streptavidin Cy5	-1,4	-0,5	<b>14,9</b>	0,8	-0,1	-2,4
humanes Serum Cy5	-2,4	-1,3	-1,6	-1,2	-1,1	-4,2
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG + humanes Serum Cy5	-4,0	-2,5	<b>33,7</b>	-0,4	-1,1	-6,6

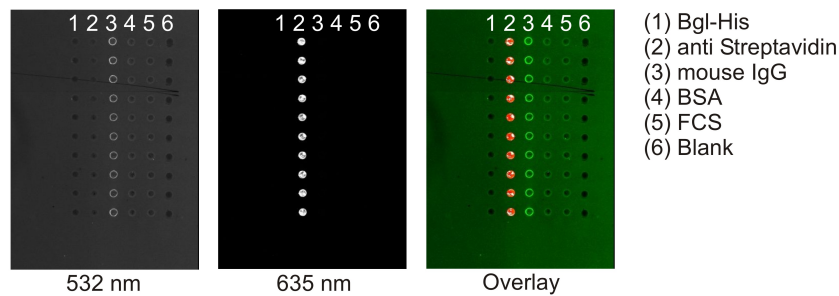


Abbildung 3.14.: Scans für das Zweifarbenexperiment. Dargestellt sind die Scans für die einzelnen Wellenlängen sowie ein mit GenePix Pro 6 erstelltes Overlay der beiden Bilder.

wurde. In Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 sind die verwendeten Proteine und Proteinmischungen sowie die unter Verwendung der verschiedenen Fänger-moleküle resultierenden SNR-Werte dargestellt. In Abbildung 3.14 sind zusätzlich die Scans des Zweifarben-Experimentes dargestellt.

Alle erwarteten spezifischen Bindungsereignisse konnten detektiert werden (Tabelle 3.6 und 3.7). Dabei wurden im Cy5 Kanal wesentlich höhere SNR-Werte erreicht als im Cy3 Kanal. Im Cy5 Kanal kommt es außerdem zu falsch positiven Signalen auf den Microarrays, die mit Streptavidin Cy5 inkubiert wurden. Allerdings fallen hier die SNR-Werte für die unspezifischen Bindungen um zwei Größenordnungen geringer aus als bei der spezifischen Bindung zwischen Streptavidin und dem anti-Streptavidin. Auch bei Verwendung von Cy5-markiertem humanem Serum kommt es zu schwachen falsch-positiven Signalen.

Insgesamt scheint die schwarze Nitrocellulose also zum Multiplexing geeignet. Alle spezifischen Bindungen konnten eindeutig nachgewiesen werden, ein Verlust der Aktivität der verwendeten Fänger-moleküle konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 3.7.: SNR-Analyse der mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Proteinen und Proteingemischen inkubierten Microarrays im Cy5 Kanal (635 nm). Korrekt positive Signale wurden grün hervorgehoben, falsch positive rot.

Inkubation mit:	Bgl-His	anti-Streptavidin	mouse IgG	BSA	FCS	Blank
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG	-2,0	2,6	-0,7	-1,8	-2,4	-1,8
Streptavidin Cy5	-1,4	<b>856,1</b>	<b>9,5</b>	-0,2	-0,1	-2,1
Alexa <sup>®</sup> 555 Penta His	1,3	6,7	-1,1	-1,8	-1,9	-2,2
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG	-2,8	<b>1239,8</b>	<b>13,4</b>	-0,9	-1,8	-2,4
+ Streptavidin Cy5						
humanes Serum Cy5	<b>6,7</b>	2,7	2,2	-1,1	1,3	-3,0
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 anti mouse IgG	<b>8,4</b>	<b>3,3</b>	2,6	0,7	<b>6,5</b>	-1,6
+ humanes Serum Cy5						

### 3.3.2. Reversed Phase Assays

Bei Reversed Phase Microarrays - auch Lysat Microarrays genannt - wird das zu untersuchende Protein bzw. die zu untersuchende Proteinmischung auf dem Microarray immobilisiert. Die Detektion erfolgt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Ein Vorteil dieses Formates besteht darin, dass auf einen Microarray sehr viele Proben gespottet werden können und diese dann unter exakt den gleichen Bedingungen in einem Experiment analysiert werden können. Darüber hinaus wurden bereits erste Versuche zur Quantifizierung von Proteinen im Reversed Phase Format publiziert. [110]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung der entwickelten Nitrocellulose-basierten Oberflächen Reverse Phase Microarrays zur Detektion von His-Tag Proteinen und Antikörpern in realen Proben verwendet. Darüber hinaus wurden Versuche zur Quantifizierung unternommen.

#### 3.3.2.1. Detektion His-getaggtter Proteine

Die Produktion und Aufreinigung von Proteinen ist ein wesentliches Aufgabenfeld der heutigen Biotechnologie. Vor allem in Hinblick auf die wachsende Bedeutung der Proteomik sind dabei zunehmend Hochdurchsatzverfahren gefragt. Moderne Automationsverfahren durch Liquid Handling Roboter wie den Theonyx Liquid Performer, der am Institut für Technische Chemie zur Verfügung steht, standardisieren die Abläufe und ermöglichen eine parallele Bearbeitung von bis zu 96 Proben. Eine Methode zur Aufreinigung von His-Tag Proteinen unter Verwendung des Theonyx Liquid Performers wurde von Jin Meng im Rahmen ihrer Master Arbeit entwickelt.<sup>7</sup> Bei einer automatisierten Proteinaufreinigung kommt es zu einem sehr hohen Probenaufkommen, was eine schnelle Analytik schwierig macht. Hier weist die Protein Microarray-Technologie zur hoch parallelisierten Analytik

<sup>7</sup>Masterarbeit von Jin Meng, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Micro-scale Aufreinigung his-getaggtter Proteine mit Ni-NTA magnetic Agarosebeads auf einer Theonyx-Plattform (2006)

deutliche Vorteile auf. Zudem ist der Microarray-Spotter mit den 96-Well-Platten, die auch beim Theonxy Liquid Performer als Probenvorlage- und Ergebnisplatten verwendet werden kompatibel, so dass sich der Einsatz der Microarray-Technologie nahezu anbietet.

Mit Hilfe der Nitrocellulose-basierten Microarrays wurden die über den Theonyx-Roboter aufgereinigten His-Tag Proteine detektiert. Dazu wurden die unterschiedlichen Fraktionen der Proteinaufreinigung direkt auf den Microarray gespottet. Der Nachweis der His-getagten Proteine erfolgte mit Alexa Fluor<sup>®</sup>647 Penta His. Die genaue Methode ist in Abschnitt 3.3.1.1 auf Seite 53 dargestellt. Der Scan des Microarrays zur Detektion von His-Tag Proteinen sowie der Verlauf der Signalintensitäten in den einzelnen Fraktionen der Protein-Aufreinigung ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Der Verlauf der Signalintensitäten spiegelt die für Proteinaufreinigungen typischen Konzentrationsverhältnisse wieder: In der Probe wird das Zielprotein detektiert. Auch im Durchlauf und in den Waschfraktionen findet sich noch Zielprotein in abnehmender Konzentration. In den Elutions-Fraktionen steigt schließlich die Konzentration des Zielproteins wieder an.

Neben der Detektion der His-Tag Proteine wurden auch Versuche zur Quantifizierung der Proteine durchgeführt. Mit Hilfe von einer auf den Chip aufgetragenen Bgl-His-Verdünnungsreihe wurde durch eine polynomische Regression die Konzentrationen in den einzelnen Proteinfractionen abgeschätzt. Die polynomische Regression ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Mit  $R^2=0,996$  ist die Qualität der Regression hoch. In Abbildung 3.16 sind jedoch auch die Grenzen der Konzentrationsbestimmung zu erkennen: Die Standardabweichungen der Signalintensitäten sind hoch und führen auch bei der berechneten Konzentration zu großen Fehlern.

Dennoch wurde versucht, die Konzentration des His-getagten Proteins in den unterschiedlichen Fraktionen der Proteinaufreinigung zu berechnen. Die berechneten Konzentrationen sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Auch der Verlauf der berechneten Konzentrationen entspricht dem für eine Proteinaufreinigung erwarteten.

Insgesamt kann der hier dargestellte Protein-Microarray also zur Detektion von Proteinen in Fraktionen der Protein-Aufreinigung eingesetzt werden. Eine Quantifizierung der Proteine ist eher kritisch zu bewerten. Aufgrund der geringen Volumina der einzelnen Fraktionen und der sich daraus ergebenden geringen absoluten Proteinmenge wurde auf ein Umpuffern, bzw. ein Verdünnen der Proben in einem speziellen Spottingpuffer verzichtet. Somit waren die Bedingungen unter denen das Zielprotein an die Membran gebunden wurde für die verschiedenen Fraktionen nicht identisch. Außerdem stellt die Probe als Zellkulturüberstand bzw. Lysat ein komplexes Proteingemisch dar, welches neben Salzen, die die Bindung des Proteins an die Membran stören können, auch weitere Proteine enthält, die mit dem Zielprotein um Bindungsplätze auf der Membran konkurrieren und zu einer Sättigung der Oberfläche führen können. Eine Bestimmung der absoluten Proteinmenge ist also unter den hier dargestellten Versuchsbedingungen nicht möglich, eine grobe Abschätzung der Proteinkonzentrationen scheint jedoch durchführbar. Dabei kann für viele Proben in einem einzelnen Experiment bestimmt werden, ob ein bestimmtes Protein in der Probe vorhanden ist oder nicht. Somit bietet sich der Microarray als Screening-Verfahren für Hochdurchsatz-Proteinaufreinigungen an. So könnte z.B. mittels Microarray zunächst bestimmt werden, welche Aufreinigungen erfolgreich verlaufen sind, indem gezielt die Elu-

### 3. Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

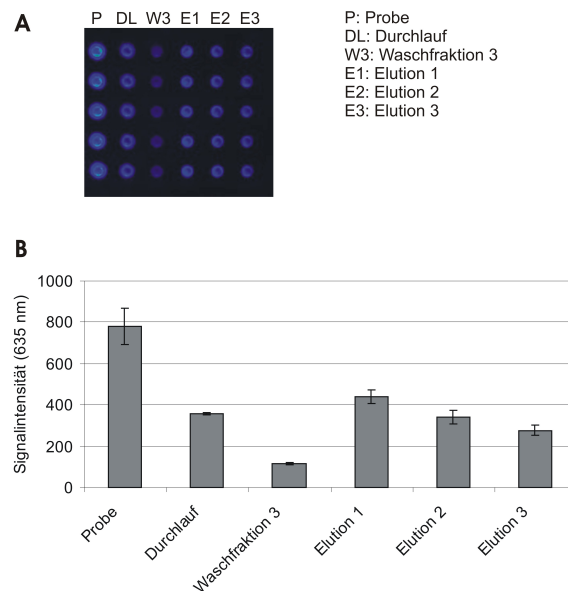


Abbildung 3.15.: Analyse der Aufreinigung von Bste-his aus *E. coli*-Lysaten. (A) Scan und Spottingschema. (B) Signalintensität in Abhängigkeit von der aufgetragenen Probe.

Tabelle 3.8.: Versuch der Quantifizierung von Bste-His in den verschiedenen Fraktionen der Proteinaufreinigung.

	Probe	Durchlauf	3. Waschfraktion	1. Elution	2. Elution	3. Elution
Volumen [ $\mu$ l]	100	100	30	15	15	15
Signal- intensität [AU]	800	356	115	441	338	277
<sup>c</sup> [ $\mu$ g/ml]	21,7	9,9	3,2	12,2	9,4	7,7

tionsfraktionen untersucht werden. Dadurch könnte vor weiteren häufig kosten- und zeit-aufwendigen Analyseverfahren wie z.B. ELISA ein Microarray-basiertes "Vor-Screening" durchgeführt werden.

#### 3.3.2.2. Detektion von Antikörpern in Zellkulturüberständen

Neben der Aufreinigung von Proteinen stellt auch die Produktion von Proteinen ein zentrales Thema der Biotechnologie dar. Dabei werden zur Herstellung von Antikörpern häufig Hybridomzelllinien eingesetzt. Zur Prozesskontrolle wird dabei neben der Zellzahl und dem Glukoseverbrauch der Zellen unter anderem auch die Konzentration des Zielproteins im Kulturüberstand bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration ist dabei wesentlich, um die Produktbildung in Abhängigkeit von den verwendeten Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Medium, pH, Begasung etc.) zu beobachten und den optimalen Zeitpunkt zur Ernte zu bestimmen sowie den Prozess zielgerichtet zu optimieren.

Es wurden Versuche zur Detektion eines gegen Penicillin G Amidase (PenG) gerichteten

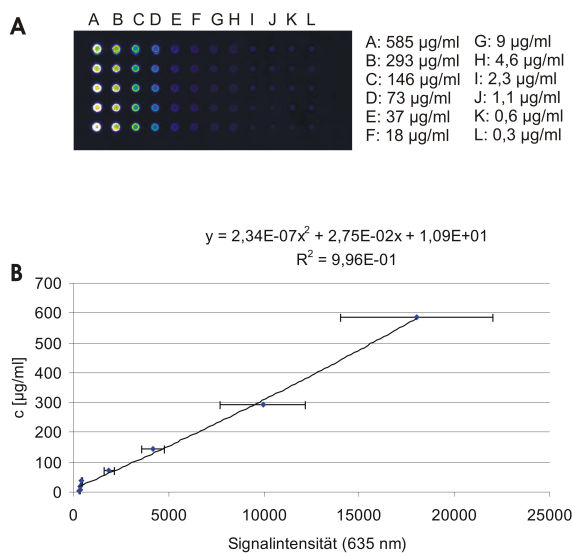


Abbildung 3.16.: Bgl-His Standardreihe auf dem Protein-Microarray. (A) Scan und Spotting-Schema. (B) Polynomische Regression.

Antikörpers in Zellkulturüberständen im Reversed Phase Format durchgeführt. Die Kultivierungen der produzierenden Hybridomzellen wurden von Fabienne Anton und Larissa Behr im Rahmen ihrer Dissertationen in serumfreien Medium durchgeführt.<sup>89</sup> Für die Microarray-Experimente wurden Zellkulturüberstände, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung entnommen wurden sowie eine aus mouse IgG bestehende Standardreihe auf das Nitrocellulose-Substrat gespottet. Die Detektion erfolgte mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG. Ausgehend von der mouse IgG Standardreihe wurden mittels polynomi-scher Regression ( $R^2=0,99$ ) die Konzentrationen des Antikörpers in den Zellkulturproben berechnet. In Abbildung 3.18 (a) sind die berechneten Konzentrationen sowie die Lebend-Zellzahl und die Zahl der toten Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer dargestellt. Der Verlauf der berechneten Konzentrationen korreliert dabei in den ersten 94 h der Kultivierung gut mit der Lebend-Zellzahl. Im weiteren Verlauf der Kultivierung sinkt die Lebend-Zellzahl dramatisch und die berechneten Konzentrationen bleiben konstant.

Um die Aussagekraft der mittels Microarray bestimmten Konzentrationen bewerten zu können, wurden die Zellkulturproben zusätzlich mit einem kommerziell erhältlichen ELISA analysiert. Die mittels Microarray und ELISA bestimmten Konzentrationen wurden einer Korrelationsanalyse unterworfen (Abbildung 3.18 b). Für die Korrelation wurde  $R^2=0,97$  bestimmt. Das ermittelte  $R^2$  liegt damit in dem Bereich, der auch von Ramaswamy et al. (2005) für den Vergleich zwischen ELISA und Reversed Phase Microarrays beschrieben wurde. [133] Trotz der guten Korrelation fällt auf, dass im Microarray-Format tendenziell höhere IgG-Konzentrationen bestimmt werden als im ELISA-Format.

Ein Vergleich von Microarray und ELISA ist in Tabelle 3.9 dargestellt. Der Microarray zeichnet sich vor allem durch geringere Kosten und ein wesentlich größeres Potential zum Hochdurchsatz aus. Dabei können auf dem Microarray hunderte von Proben parallel analy-

<sup>8</sup>Dissertation von Fabienne Anton, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

<sup>9</sup>Dissertation von Larissa Behr, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

### 3. Ergebnisse: Entwicklung Membran-basierter Protein-Microarrays

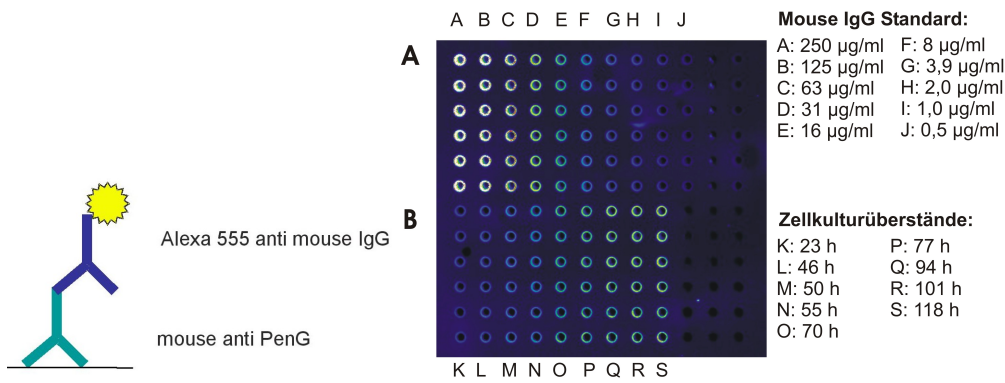


Abbildung 3.17.: Experimenteller Aufbau und Scan des Microarrays zur Quantifizierung eines Antikörpers in Zellkulturüberständen.

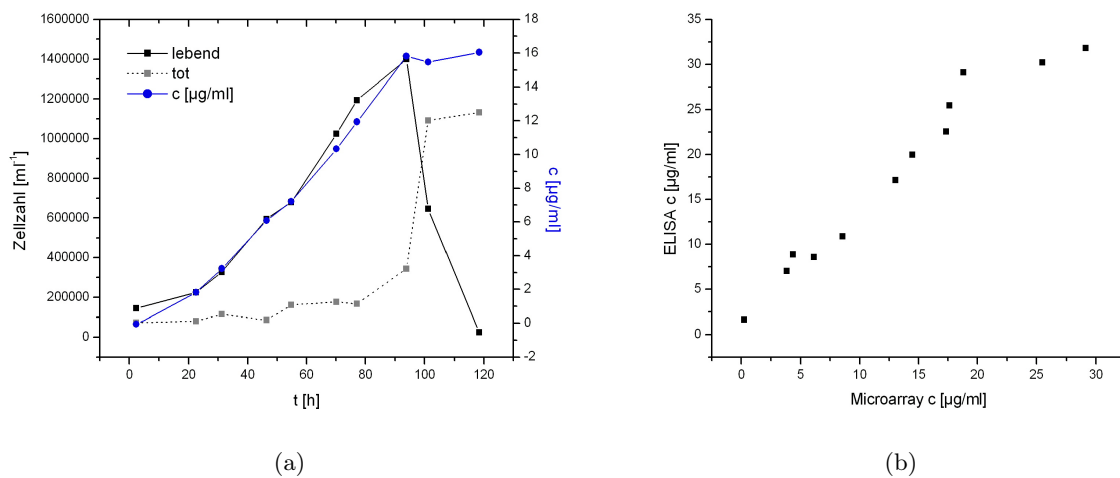


Abbildung 3.18.: Verlauf der mittels Microarray bestimmten Konzentrationen gegen die Kultivierungsdauer sowie der Vergleich der mittels Microarray und ELISA bestimmten Konzentrationen.

siert werden. Dadurch können zur besseren statistischen Absicherung der Ergebnisse auch Replikate vermessen werden, auf die beim ELISA aus Kostengründen häufig verzichtet wird. Darüber hinaus ist das Signal auf dem Microarray über Monate stabil, während es beim Enzym-basierten ELISA ein ca. 15 minütiges Zeitfenster gibt, in dem die Auswertung möglich ist.

#### 3.3.3. Sandwich Assays

Im Sandwich-Format werden Fängerantikörper auf dem Microarray-Substrat immobilisiert. Diese Antikörper binden das Target-Protein, welches mit Hilfe von weiteren markierten Antikörpern detektiert wird. Ein Vorteil des Sandwich-Formates ist, dass das zu untersuchende Proteingemisch nicht gelabelt werden muss. Dadurch wird die Probenvorbereitung erleichtert und der Probendurchsatz gesteigert. Darüber hinaus wird die Spezifität des Assays durch Verwendung von zwei Antikörpern erhöht. [98] Die Sensitivität beim Sandwich-Assay ist dabei im allgemeinen höher als beim Forward-Phase-Assay. [139]

Tabelle 3.9.: Vergleich Microarray/ELISA in Anlehnung an Mezzasoma et al.(2002) [109]

Schritt	Parameter	ELISA	Microarray
Probenauftrag	Verdünnung	1:1000	-
	Volumen	200 µl (je Well)	800 µl (je Spot)
	Inkubation	30 min	15 min
Konjugat	Volumen	50 µl (je Well)	800 µl (pro Microarray)
	Inkubation	0,5 h	16 h
Substrat	Volumen	50 µl (je Well)	-
	Inkubation	30 min	-
Auswertung	Signalstabilität	ca. 15 min	über 3 Monate
Assaydauer		2,5 h	17,5 h
Kosten		ca. 500 € je Kit (ca. 400 Proben)	ca. 15 € je Microarray (potentiell mehrere hundert Proben)

### 3.3.3.1. Detektion eines Antikörpers aus Zellkulturüberständen

In Anlehnung an das von Reck et al. (2007) publizierte Protokoll für einen Sandwich-Assay zur Detektion von humanem Interferon- $\gamma$  auf den Nitrocellulose-basierten Microarrays wurde ein Sandwich-Assay zur Detektion des gegen Penicillin G Amidase gerichteten Antikörpers aus Zellkulturüberständen entwickelt. [134] Es wurden Kulturüberstände der selben Zelllinie verwendet, die auch im Reversed Phase Format eingesetzt wurden (Abschnitt 3.3.2.2). Dazu wurde Penicillin G Amidase (PenG) als Fängermolekül gespottet. Der Aufbau des Sandwich ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

Es wurde Penicillin G Amidase in Konzentrationen von 2 mg/ml auf der weißen Nitrocellulose-Membran gespottet. Der gegen Pen G gerichtete Antikörper wurde aus den Zellkulturüberständen unter Verwendung einer Protein G Säule aufgereinigt und in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS + 0,2% TopBlock auf dem Microarray inkubiert (2 h, 25°C). Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 anti mouse IgG (2 µg/ml, 2 h, 25°C). Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde der Slide dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Auf dem Microarray konnte das anti PenG eindeutig mit einer exzellenten  $SNR_{Max}$  von 1502 nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurden Versuche zur Quantifizierung von anti PenG im Sandwich-Format durchgeführt. Dazu wurden mit weißer Nitrocellulose beschichtete Microarrays mit 16 getrennten Membranfeldern verwendet (siehe Abbildung 2.5 auf Seite 23). Die Verwendung dieses 16-Pad Microarrays ermöglicht mit Hilfe einer speziellen Inkubationskammer die Unterteilung des Microarrays in 16 voneinander getrennte Reaktionsräume. Jeder der Reaktionsräume kann mit 200 µl Flüssigkeit befüllt werden. Dadurch können unterschiedliche Proben auf einem Microarray inkubiert werden. Ein möglicher Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.19 dargestellt. So können z.B. 8 der Felder zur Erstellung einer Standardkurve verwendet werden, wobei zur Inkubation aufgereinigtes Target-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet werden kann. Die restlichen 8 Felder stehen

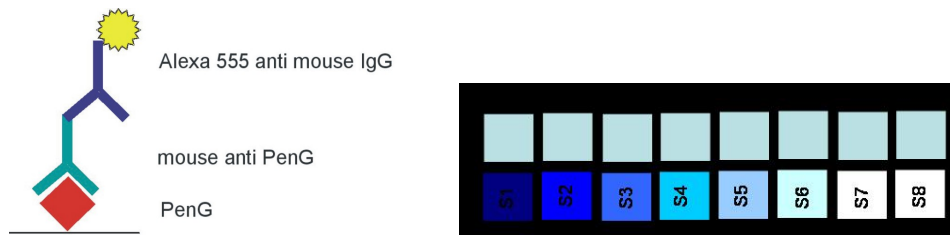


Abbildung 3.19.: Aufbau des Sandwich zur Detektion des gegen Penicillin G Amidase (PenG) gerichteten Antikörpers sowie Versuchsaufbau zur Quantifizierung im 16-Pad Format.

zur Inkubation mit Proben unbekannter Konzentration zur Verfügung.

Als erster Schritt zur Erstellung eines solchen Sandwich-Assays zur Quantifizierung von anti PenG wurde eine anti PenG Verdünnungsreihe auf die einzelnen Felder des 16-Pad Microarrays aufgetragen. Dabei wurden Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\text{ng/ml}$ , 10  $\text{ng/ml}$ , 1  $\text{ng/ml}$ , 500  $\text{pg/ml}$  in PBS + 0,2% TopBlock verwendet. Um Kreuzkontaminationen von einem Reaktionsraum in den anderen zu vermeiden, wurden die einzelnen Pads des Microarrays anschließend dreimal für jeweils 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Diese Waschschritte wurden nach dem Entfernen der Inkubationskammer wiederholt. Der zweite Inkubationsschritt erfolgte für 2 h mit Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG der Konzentrationen 2  $\mu\text{g/ml}$ . Abschließend wurde wiederum mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen.

Die Analyse der Signalintensität und der SNR in Abhängigkeit von der Target-Protein-Konzentration ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Die Signalintensität steigt mit zunehmender Konzentration an anti PenG an, allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Signalintensität gefunden werden, der die Bestimmung unbekannter Konzentrationen mittels Regression erlaubt. Um die Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten in Abhängigkeit vom Feld zu bestimmen, wurden vier Felder eines 16-Pad Microarrays mit der selben Konzentration anti PenG (100  $\text{ng/ml}$ ) inkubiert. Hier wurde für die Signalintensität eine Standardabweichung von 26,5% gefunden. Ob diese Feld-zu-Feld Variationen in Inhomogenitäten der Membran begründet sind oder hier andere Faktoren eine Rolle spielen, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Im Rahmen der bisher durchgeführten Versuche konnte also noch keine Quantifizierung im Sandwich Format durchgeführt werden. Der Sandwich-Assay konnte jedoch erfolgreich aufgebaut werden und zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Sensitivität aus. So konnten auch noch anti PenG Konzentrationen von 0,5  $\text{ng/ml}$  mit einer SNR von 4 detektiert werden (Abb. 3.20). Der in Abschnitt 3.3.2.2 vorgestellten Reversed Phase Assay zur Detektion von anti PenG weist mit einem Detektionslimit von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  eine um den Faktor 1000 höhere Nachweisgrenze auf. Darüber hinaus wird in dem hier vorgestellten Sandwich-Assay nicht nur die Anwesenheit des Target-Proteins bestimmt. Darüber hinaus wird auch seine Funktionalität nachgewiesen, da das anti PenG hier seine Fähigkeit zur Bindung an PenG beweisen muss, um im Sandwich-Format zu einem Signal zu führen.



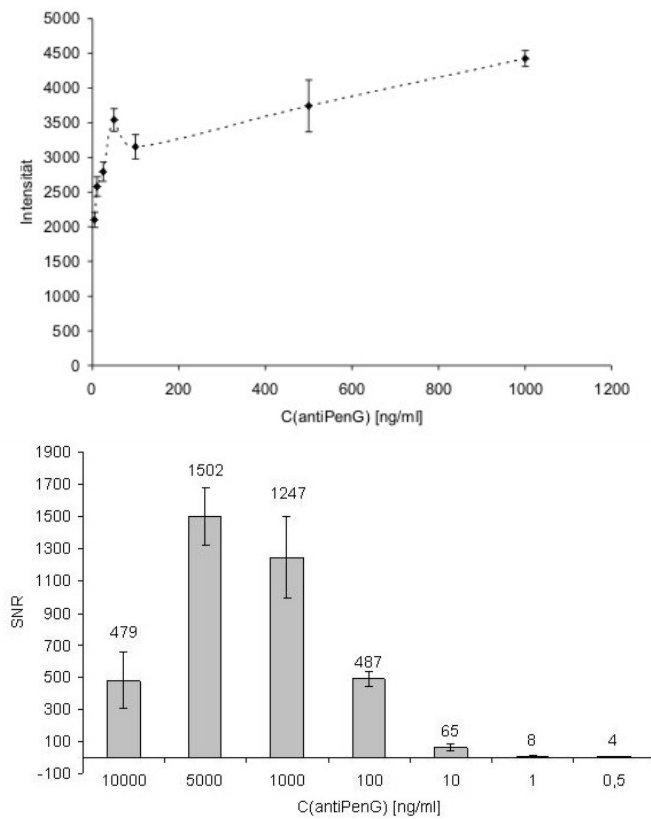


Abbildung 3.20.: Analyse der Signalintensität und der SNR in Abhängigkeit von der Konzentration des Target-Proteins im Sandwich Format bestimmt unter Verwendung eines 16-Pad-Slides.

### 3.3.3.2. Detektion von Collagen und Osteopontin in Zellkulturüberständen

Im *Tissue Engineering* wird versucht, funktionales Gewebe im Labor zu erzeugen. Dabei werden z.B. zur Züchtung von Knochenzellen häufig Vorläuferzellen verwendet. Um die erfolgreiche Differenzierung der Vorläuferzellen zu Zellen des gewünschten Gewebes zu überprüfen, wird die Bildung bestimmter Markerproteine verfolgt. Dazu werden heute häufig Expressionsanalysen auf RNA-Ebene durchgeführt. Da der Zusammenhang zwischen dem so ermittelten Expressionsniveau und der tatsächlich vorhandenen Markerprotein-Konzentration aber eher schwach ausgeprägt ist, werden zunehmend Systeme zur direkten Detektion der Marker auf Protein-Ebene gesucht. Da die in Zellkulturüberständen zu erwartende Konzentration der Markerproteine gering ist, bietet sich ein Microarray im sensitiven Sandwich Format zu ihrer Detektion an.

Als Modellproteine zur Etablierung eines solchen Sandwich-Assays wurden Collagen I und Osteopontin als Marker der Knochenbildung verwendet. Zur Etablierung eines Sandwich-Assays ist die geeignete Auswahl von Fänger- und Detektions-Antikörper entscheidend. Dabei ist es theoretisch möglich, einen polyklonalen Antikörper als Fänger- und Detektions-Antikörper zu verwenden. Es ist jedoch von Vorteil, einen monoklonalen Antikörper als Fänger zu verwenden und einen polyklonalen Antikörper als Detektionsreagenz. [125] Dabei wird die hohe Spezifität des monoklonalen Antikörpers zur Bindung des Targets ausgenutzt. Die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers zur Detektion des gebundenen Targets erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Epitope des Targets zur Erkennung durch den zweiten Antikörper zur Verfügung stehen und nicht durch die Bindung des Targets an den ersten Antikörper verdeckt sind. Darüber hinaus besitzen polyklonale Antikörper häufig höhere Affinitäten als monoklonale Antikörper. [125] Ausgehend von diesen theoretischen Betrachtungen wurden monoklonale Antikörper gegen Osteopontin und Collagen I als Fängermoleküle verwendet. Als Detektionsantikörper wurden biotinylierte polyklonale Antikörper gegen die selben Targets eingesetzt. Abschließend wurde mit Cy3-markiertem Streptavidin inkubiert. Der Aufbau des Sandwichs ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Zunächst wurden Versuche mit reinen Proteinen (2,5 µg/ml Collagen bzw. 2 µg/ml Osteopontin) durchgeführt. Zusätzlich wurden Versuche ohne Targetprotein durchgeführt, um eine eventuell stattfindende Bindung des Detektionsantikörpers direkt an den Fänger-Antikörper nachweisen zu können. Zur Demonstration der Anwendbarkeit des Systems mit realen Proben wurden zusätzlich Versuche mit Zellkulturüberständen durchgeführt. Dazu wurden Kulturüberstände der humanen Osteosarkom-Zelllinie SAOS-2 verwendet, die von Solvig Diederichs im Rahmen ihrer Dissertation kultiviert wurden.<sup>10</sup> Die SNR-Analysen der Microarrays sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

Die Detektion von Osteopontin im Sandwich-Format konnte erfolgreich durchgeführt werden. Das reine Protein (2 µg/ml) konnte mit einer SNR von 71 eindeutig nachgewiesen werden. Die Negativ-Kontrolle, bei der auf eine Inkubation mit Osteopontin verzichtet wurde, zeigte keine Signale. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Detektionsantikörper oder das Streptavidin unspezifisch an den Fängerantikörper gebunden werden und somit zum Signal beitragen. Auch im Zellkulturüberstand konnte Osteopontin mit einer

<sup>10</sup>Dissertation von Solvig Diederichs, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

SNR von 374 nachgewiesen werden. Es konnte also ein spezifischer Assay zur Detektion von Osteopontin in Zellkulturüberständen entwickelt werden.

Die Detektion von Collagen I gelang für das reine Protein (2,5 µg/ml) mit einer SNR von 58. Allerdings wurde hier auch für die Negativkontrolle in Abwesenheit des Proteins ein schwaches Signal mit einer SNR von 6 detektiert. Eine unspezifische Bindung von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin an den immobilisierten monoklonalen Antikörper konnte in weiteren Versuchen nicht festgestellt werden. Also findet eine unspezifische Bindung des biotinylierten Detektionsantikörpers direkt an den Fängerantikörper statt. Die für den Zellkulturüberstand gemessene SNR liegt in der gleichen Größenordnung wie die SNR für die Negativ-Kontrolle. Die Konzentration dieses Markerproteins liegt in dem hier verwendeten Zellkulturüberstand also unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Assays.

Versuche zur Quantifizierung der Markerproteine mittels 16-Pad Microarrays wurden aufgrund der in Abschnitt 3.3.3.1 beschriebenen großen Variationen von Feld zu Feld bisher nicht durchgeführt. Eine Quantifizierung der Markerproteine würde allerdings zur Beobachtung und Kontrolle der Differenzierung von Zellen wesentlich beitragen, so dass die Bemühungen zur Quantifizierung im sensitiven Sandwich-Format in weiteren Versuchen vorangetrieben werden sollten.

Unter Verwendung der hier beschriebenen Systeme zur Detektion von Osteopontin und Collagen I wurden auch Versuche zum Multiplexing durchgeführt. Dazu wurden die Fängerantikörper gegen Osteopontin und Collagen I nebeneinander auf dem Microarray immobilisiert. Es wurden wie oben beschrieben Versuche mit reinen Proteinen, mit Proteingemischen sowie mit Zellkulturüberständen und Zellkulturmedien durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der gegen Collagen I gerichtete biotinylierte Detektionsantikörper nicht nur unspezifisch an den immobilisierten monoklonalen Antikörper gegen Collagen, sondern auch an den monoklonalen Antikörper gegen Osteopontin bindet. Dabei wurden falsch-positive Signale mit einer SNR von 13 beobachtet. Der Detektionsantikörper Collagen I ist also nicht geeignet zum Einsatz im Sandwich-Format. Dennoch konnte die potentielle Anwendbarkeit des Sandwich-Formats zur dualen Protein-Detektion demonstriert werden und die Versuche sollten unter Verwendung eines anderen Detektionsantikörpers wiederholt werden.

In Zukunft wäre die Entwicklung eines Microarrays zur parallelen Detektion mehrerer Markerproteine wünschenswert. Könnte dieses System auf die 16-Pad-Microarrays übertragen werden, stünde ein sensitiver Assay zur Verfolgung der Konzentrationen mehrerer Markerproteine im zeitlichen Verlauf von Kultivierungen zur Verfügung. Somit könnte der Prozess der Differenzierung direkt auf Proteomebene verfolgt werden.

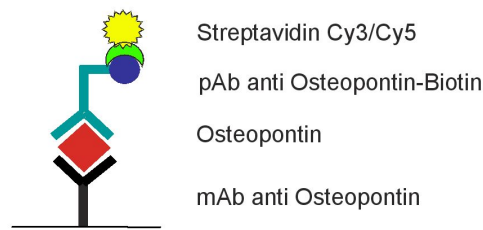
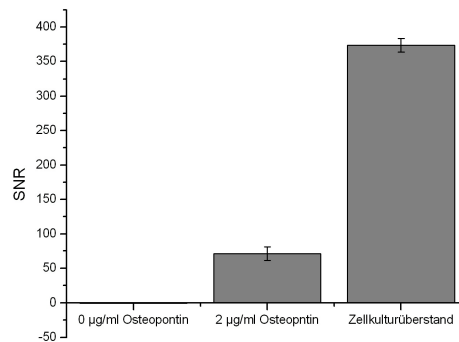
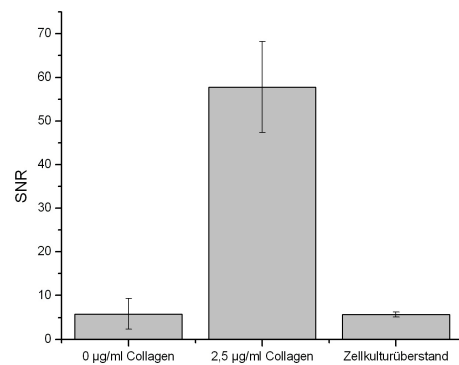


Abbildung 3.21.: Schematischer Aufbau des Sandwich-Assays zur Detektion von Osteopontin.



(a) Osteopontin.



(b) Collagen I.

Abbildung 3.22.: SNR-Analyse der Microarrays zur Detektion von Osteopontin und Collagen I im Sandwich-Format. Aufgetragen wurden jeweils reines Protein sowie Zellkulturüberstände. Außerdem wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dabei wurde auf die Inkubation mit dem Target verzichtet, um eine eventuell stattfindende Bindung des Detektionsantikörpers oder des Streptavidins an den immobilisierten Antikörper feststellen zu können.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick I

Im Rahmen des ersten Teils der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Membranen der Sartorius Stedim Biotech auf ihre Eignung zum Einsatz als Substrat für Protein-Microarrays untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Membranen in Abhängigkeit von ihrer Porengröße, der Membrandicke und ihrer Einfärbung unterschiedlich gut für Microarray-Anwendungen einsetzbar sind. Darüber hinaus wurde die Verklebungstechnik mit der die Membran auf dem Microarray fixiert wird als kritischer Faktor ermittelt. Die Sartorius Stedim Biotech konnte mittlerweile eine verklebungsfreie Technik zur Fixierung der Membran entwickeln. Die von der Sartorius Stedim Biotech unter Einbeziehung der hier dargestellten Ergebnisse entwickelten Protein-Microarrays sind mittlerweile als Nexterion<sup>®</sup>Slides NC über die Firma SCHOTT kommerziell erhältlich.

Die Charakterisierung der entwickelten Microarrays und der Vergleich mit weiteren kommerziell erhältlichen Substraten zeigt dabei, dass die hier entwickelten Microarrays über einen breiten dynamischen Bereich und ein niedriges Detektionslimit verfügen. Sie eignen sich somit gut zum Einsatz in der Proteomik. Dabei zeichnete sich vor allem die schwarze Nitrocellulosemembran durch eine niedrige Autofluoreszenz und dadurch bedingt durch hohe SNR Werte aus. Durch Verwendung der schwarzen Membranen konnte somit die bei bisher üblichen Nitrocellulose-basierten Microarrays als limitierender Faktor wirkende Eigenfluoreszenz der Membran wesentlich verbessert werden.

Die breite Einsetzbarkeit des entwickelten Microarrays wurde durch Etablierung verschiedener Assays im Forward Phase-, Reversed Phase- und Sandwich Format bestätigt. Dabei wurden Microarrays zur Anwendung in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie wie z.B. der Proteinproduktion und -aufreinigung sowie dem *Tissue Engineering* entwickelt. Dabei wurden bewusst auch komplexe Proben (Lysate und Zellkulturüberstände) verwendet.

- Im Forward Phase Format wurde dabei ein Assay zur Detektion von His-Tag Proteinen entwickelt. Dieser Microarray ermöglicht z.B. die Bewertung der Markierungseffizienz von His-Tag Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen (siehe Abschnitt 3.3.1.1 auf Seite 53).
- Auch im Reversed Phase Format wurde ein Microarray zur Detektion von His-Tag Proteinen in *E. coli* Lysaten und verschiedenen Fraktionen einer Proteinaufreinigung entwickelt. Dieser Microarray ermöglicht die Abschätzung der Konzentration des Target-Proteins im zeitlichen Verlauf der Proteinaufreinigung (Abschnitt 3.3.2.1 auf Seite 56).
- Es wurde ein Microarray zur Detektion von Antikörpern in Zellkulturüberständen im Reversed Phase Format entwickelt. Mit Hilfe des Microarrays wurde der zeitliche Verlauf der IgG Produktion einer Hybridomzelllinien erfolgreich verfolgt. Dieser

Microarray wurde auch zur Quantifizierung des Target-Proteins verwendet und die ermittelten Konzentrationen zeigten eine hohe Korrelation mit den mittels ELISA bestimmten Konzentrationen ( $R^2=0,97$ ). Dieser Microarray stellt somit eine kostengünstige Alternative zum ELISA dar (Abschnitt 3.3.2.2 auf Seite 58).

- Auch im Sandwich Format wurde ein Microarray zur Detektion von IgG aus Zellkulturüberständen entwickelt. Dieser Microarray weist mit 0,5 pg/ml ein ausgezeichnetes Detektionslimit auf (Abschnitt 3.3.3.1 auf Seite 61).
- Es wurden darüber hinaus Microarrays zur Detektion von Collagen I und Osteopontin im Sandwich Format entwickelt. Osteopontin konnte als Marker der Differenzierung auch in Zellkulturüberständen einer humanen Osteosarkom-Zelllinie detektiert werden ( 3.3.3.2 auf Seite 64).

Die breite Anwendbarkeit der entwickelten Microarray-Substrate konnte unter Verwendung von realen Proben erfolgreich demonstriert werden. Dabei wurden auch Möglichkeiten zur Quantifizierung im Microarray Format dargestellt. Es konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass die Verwendung der hier entwickelten Nitrocellulose-basierten Microarrays im Vergleich zu Glas-Substraten zu einer Erhöhung der Stabilität von immobilisierten Antikörpern führt (Tabelle 3.5 auf Seite 54).

## Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl das Forward Phase Format, das Reversed Phase Format und der Sandwich Assay zur Detektion von IgG verwendet. In Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit bestimmten Detektionslimits für IgG in Abhängigkeit von dem Assay-Format dargestellt.

Tabelle 4.1.: Detektionslimit für IgG in Abhängigkeit vom verwendeten Format.

Format	Forward Phase	Reversed Phase	Sandwich
Detektionslimit (IgG)	200 pg/ml	0,5 µg/ml	0,5 ng/ml
	1,3 pM	3,3 nM	3,3 pM

Neben dem Forward Phase Format stellt das Sandwich Format das sensitivste System dar. Dabei kann im Sandwich Format im Gegensatz zum Forward Phase Format auf ein Labeling der Probe verzichtet werden. Dieses Labeling ist bei komplexen Proben schwierig und kann zu Veränderungen der Probenzusammensetzung führen. Zudem ist im Sandwich Format die Spezifität durch Verwendung zweier Antikörper gegen das gleich Target im Vergleich zu den anderen Microarray Formaten höher. Leider waren Versuche zur Quantifizierung im Sandwich Format unter Verwendung von 16-Pad Slides im Rahmen dieser Dissertation nicht erfolgreich. Hier besteht weiter Bedarf zur Optimierung der Reproduzierbarkeit.

In Zukunft wäre die Entwicklung eines Microarrays zur parallelen Detektion mehrerer Proteine im Sandwich-Format wünschenswert. Könnte dieses System auf die 16-Pad-Microarrays übertragen werden, stünde ein sensitiver Assay zur Verfolgung der Konzentrationen mehrerer Proteine im zeitlichen Verlauf von Kultivierungen zur Verfügung. Somit könnte z.B. der Prozess der Differenzierung von Zellen direkt auf Proteomebene verfolgt werden.

Teil II.

## Aptamere als alternative Fängermoleküle auf Microarrays





# 1. Aptamere und ihre Anwendungen

Bei Aptameren handelt es sich um funktionelle Nucleinsäuren, die spezifisch an Proteine, Peptide, Aminosäuren, Nucleotide und andere organische oder anorganische Substanzen binden können. Diese Oligonucleotide nicht natürlichen Ursprungs können durch einen *in vitro* Selektionsprozess aus DNA- oder RNA-Bibliotheken gewonnen werden. Die Entdeckung der Aptamere erfolgte 1990 unabhängig voneinander durch G.F. Joyce, J.W. Szostak und L. Gold. [159, 33, 135] Die Bezeichnung "Aptamer" wurde in Anlehnung an das lateinische *aptus* (passend, genau angepasst) gewählt. [33] Wie ihr Name andeutet, besitzen Aptamere die Fähigkeit, ihr Zielmolekül aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur molekular zu erkennen und spezifisch zu binden. Als Nucleinsäuren können Aptamere also komplexe Strukturen einnehmen und dabei auch Funktionen ausüben, die bisher ausschließlich den Proteinen zugeordnet wurden. [14] Daher eignen sich Aptamere ebenso wie Antikörper als Fänger- oder Detektionsmoleküle in Anwendungen, die auf molekularer Erkennung basieren. [69]

Im Folgenden werden Aptamere, ihre Entwicklung sowie ihre Anwendungen kurz vorgestellt. Schwerpunkte werden dabei auf den Selektionsprozess, die Mechanismen der molekularen Erkennung durch Aptamere sowie die Verwendung von Aptameren in der Biosensorik sowie insbesondere in der Protein-Microarray-Technologie gelegt.

## 1.1. Entwicklung von Aptameren mittels SELEX

Aptamere werden mit Hilfe einer evolutiven Methode durch einen iterativen Prozess aus Variation, Selektion und Replikation entwickelt. Für das *in vitro* Selektionsverfahren, mit dessen Hilfe Aptamere entwickelt werden, wurde von Tuerk und Gold das Akronym SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) eingeführt. [159] Das Verfahren beruht in Analogie zu natürlichen Evolutionsprozessen auf einem zyklischen Prozess aus Selektion und Amplifikation, der so oft wiederholt wird bis die Nucleinsäuren die gewünschten Bindungseigenschaften gegenüber dem Targetmolekül aufweisen. Führt man in den Amplifikationsschritt noch eine Veränderung des Pools ein, z. B. durch mutagene PCR (*Polymerase Chain Reaction*), so spricht man auch von einer *in vitro* Evolution. Als Ausgangspunkt für die Selektion wird eine Bibliothek aus möglichst vielen unterschiedlichen Oligonucleotidsequenzen verwendet. Diese ist durch Variation oder Randomisierung eines Bereichs eines strukturell bekannten Nucleinsäure-Moleküls zugänglich. Bei einer Variation von zehn Nucleotiden, kann eine Bibliothek mit einer Komplexität von  $4^{10}$  ( $10^6$ ) verschiedenen Sequenzen generiert werden. Deutlich größere Bibliotheken werden durch kombinatorische DNA-Synthese hergestellt. Die Random-Regionen mit zufälliger Basenabfolge werden von definierten Primer-Bindungsseiten flankiert, welche die Amplifikation

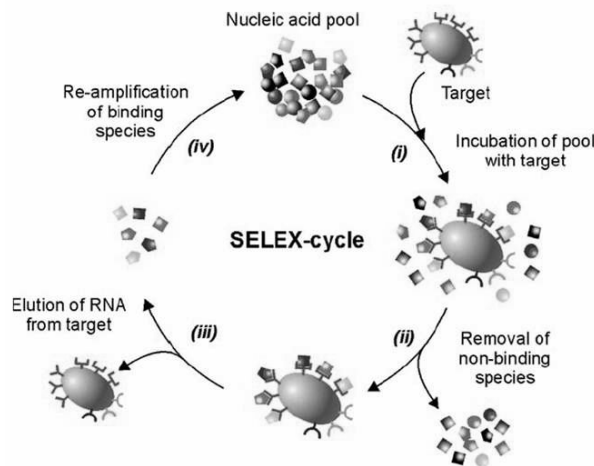


Abbildung 1.1.: Die SELEX als iterativer Prozess aus Selektion und Amplifikation. Dargestellt ist die Inkubation zwischen Oligonukleotidbibliothek und dem immobilisierten Target (i). Während der Inkubation bindet ein geringer Anteil der Oligonukleotidsequenzen an das Target, nicht bindende Sequenzen werden durch Waschen entfernt (ii). Die bindenden Sequenzen werden eluiert (iii) und dienen nach Amplifikation (iv) als verkleinerte Bibliothek für einen neuen SELEX-Zyklus. Quelle: Proske et al. (2005). [129]

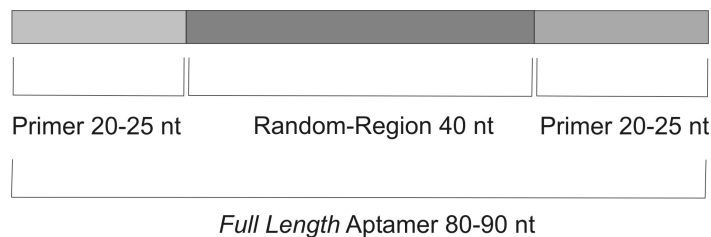


Abbildung 1.2.: Üblicherweise enthalten die in der SELEX eingesetzten Oligonukleotide eine 40 Basen umfassende Random-Region. Unter Berücksichtigung der Primer ergeben sich *Full Length* Aptamere von 80-90 nt. Eine Verkürzung um die Anteile, die zur Bindung des Targets nicht notwendig sind, führt zu Aptameren, die ca. 40 Nucleotide lang sind. Es wurden jedoch auch schon kürzere Aptamere publiziert.

mittels PCR ermöglichen. Die Primerlänge beträgt dabei üblicherweise 20 – 25 Basen. Theoretisch kann eine Bibliothek bei einer 40 Basen umfassenden Random-Region bis zu  $4^{40}$  ( $1,2^{24}$ ) Oligonukleotidsequenzen enthalten. Tatsächlich besteht eine mittels Festphasensynthese erstellte Bibliothek bei einem Maßstab von  $1 \mu\text{mol}$  aus  $10^{14}$  bis  $10^{15}$  individuellen Sequenzen. [69] Es können Bibliotheken mit bis zu 120 randomisierten Nucleotiden hergestellt werden. So ist eine theoretische Komplexität von bis zu  $4^{120}$  ( $1,8^{72}$ ) verschiedenen Molekülen denkbar, von denen experimentell etwa  $10^{12} - 10^{18}$  erhalten werden können. [79]

Im Rahmen des SELEX-Prozesses wird die Bibliothek mit dem Target, gegen welches ein Aptamer generiert werden soll, in Kontakt gebracht. Eine kleine Fraktion der Nucleinsäuresequenzen interagiert dabei mit dem Target. Die Dauer der Inkubation zwischen Aptamer und Target kann variiert werden, um Aptamere mit gewünschter Kinetik zu erhalten. [116] Es erfolgt eine physikalische Abtrennung der bindenden von den nicht bin-

denden Sequenzen. Bei der Selektion von Aptameren, die gegen Proteine gerichtet sind kommt z.B. die Nitrocellulosefilter-Technik zum Einsatz. Proteine binden auf Nitrocellulose, während Nukleinsäuren nicht gebunden werden. Dies wird zur Abtrennung der Protein-Nukleinsäurekomplexe genutzt. Beim Einsatz kleinerer Moleküle als Target werden diese üblicherweise auf festen Phasen immobilisiert. Somit steht eine Affinitätsmatrix zur Anreicherung bindender Nukleinsäure-Sequenzen zur Verfügung, nicht bindende Sequenzen werden ausgewaschen. Nach der Isolierung der Binder-Population erfolgt die Amplifikation der entsprechenden Sequenzen mittels PCR. Die nun verkleinerte Bibliothek der bindenden Sequenzen wird als Ausgangspunkt für den nächsten Selektions-Amplifikations-Zyklus genutzt. In den ersten Zyklen interagiert nur ein geringer Anteil (0,1-0,5%) der Sequenzen mit dem Target. [116] Die Anreicherungseffizienz während der SELEX ist dabei abhängig von der Stringenz der Selektion. Für die meisten Targets sind 8-15 Zyklen notwendig. Darüber hinaus werden Negativ-Selektionen durchgeführt, die zur Entfernung von Sequenzen dienen, die unspezifisch an die feste Phase binden. Abschließend erfolgt das Klonieren und Sequenzieren der einzelnen Oligonukleotide, welche durch Bindungsstudien näher charakterisiert werden können. Üblicherweise werden 40 Basen umfassende Random-Regionen verwendet. Die zunächst selektierten *Full Length*-Aptamere enthalten neben der ursprünglichen Random-Region auch die Primer-Bindungs-Regionen die zur Amplifikation notwendig sind und weisen durchschnittlich eine Länge von 80-90 nt auf (Abbildung 1.2). Häufig sind die konstanten Regionen zur Bindung des Targets nicht notwendig. Eine Verkürzung um die Anteile die zur korrekten Faltung des Aptamers und somit zur Bindung des Targets nicht notwendig sind kann zu Aptameren führen, die kürzer als 40 nt sind. [159, 70, 156, 74]

Eine Erhöhung der Spezifität von Aptameren ist mittels *Counter*-SELEX möglich. Dabei werden Sequenzen entfernt, die nicht nur das Target sondern auch dem Target nahe verwandten Strukturen binden. [73] Dazu wird bei der *Counter*-SELEX während der Selektion die Population an Oligonukleotiden, die an das Target gebunden haben, einer Affinitätselution mit strukturellen Analogen des Targets unterworfen. So selektierte Aptamere können eine bemerkenswerte Spezifitäten aufweisen und Targets basierend auf minimalen strukturellen Unterschieden diskriminieren. So können Targets z.B. aufgrund des Vorhandenseins bzw. der Abwesenheit einer Methyl-Gruppe, [72] einer Hydroxy-Gruppe, [143, 102] oder aber auch anhand von Enantiomere-selektivität [143, 51] unterschieden werden.

Ein SELEX-Zyklus dauert manuell durchgeführt etwa 2 Tage. Inklusiv der Klonierungen und der Sequenzierung ergibt sich für ein SELEX-Experiment eine Dauer von ca. 2-3 Monaten. [69] Einmal sequenziert, kann ein Aptamer jederzeit mittels chemischer Synthese produziert werden, wofür im nmol Maßstab etwa 3 Tage benötigt werden. [69] Somit nimmt die Selektion von Aptameren wesentlich weniger Zeit in Anspruch als die Herstellung einer Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper produziert. Die Automatisierung des SELEX-Prozesses macht ihn noch schneller und ökonomischer. [25, 29] Unter Verwendung moderner Automationsplattformen kann rund um die Uhr selektiert werden. Die SELEX kann dabei für eine große Anzahl an Targets parallel durchgeführt werden [35, 23, 24] und die Prozesszeiten können auf wenige Wochen herabgesetzt werden. [130] So berichten Collet et al. (2005), in einem Zeitraum von 2-3 Tagen parallel Aptamere gegen acht Targets selektieren zu können. [20]

Der Einsatz moderner Nukleinsäuretechniken ermöglicht auch noch nach abgeschlossener Selektion eine Modifikation der Aptamere. Im Gegensatz dazu ist die Veränderung oder Optimierung von Antikörpern im allgemeinen nicht möglich. Um einen für eine spezielle Anwendung geeigneten Antikörper zu erhalten, ist es notwendig, einen große Anzahl an Hybridomzellen zu screenen. Ein bereits erhaltenes Aptamer kann dagegen an neue Anforderungen angepasst werden. Dazu kann z.B. eine *Biased*-Bibliothek eingesetzt werden, welche auf der Sequenz eines bereits existierenden Aptamers beruht. Die *Biased*-Bibliothek wird durch Variation des bekannten Aptamers erstellt. [95, 113] Auch durch Kombination der SELEX mit der *Error-Prone*-PCR können die Eigenschaften von bereits sequenzierten Aptameren modifiziert werden. Dabei werden während der PCR Punktmutationen (ca. 1-10% der Basen) in die Nukleinsäuresequenzen eingeführt. Noch weiter geht der Ansatz der Nichthomologen-Random-Rekombination (NRR). Hierbei werden DNA-Fragmente mehrerer Aptamere, die gegen das selbe Target gerichtet sind, zufällig rekombiniert. Bittker et al. (2002) konnten mit Hilfe der NRR ausgehend von zwei Sequenzen mit mäßiger Affinität gegenüber Streptavidin ein Aptamer isolieren, das im Vergleich zu den ursprünglich mittels SELEX entwickelten Aptameren eine 46-fach höhere Affinität zum Target aufweist. [9]

### 1.1.1. DNA und RNA Aptamere sowie ihre Modifikationen

Durch Modifikationen können die Eigenschaften von Aptameren gezielt beeinflusst werden. Dabei können zwei unterschiedliche Ansätze unterschieden werden: die postselektive Modifikation von Aptameren nach der SELEX und die präselektive Modifikation unter Verwendung modifizierter Bibliotheken während der SELEX. Der Vorteil der nachträglichen Modifikation besteht in der Möglichkeit, auch bereits sequenzierte Aptameren stabilisieren zu können und in ihren Eigenschaften zu verändern. Die postselektive Modifikation eines Aptamers kann jedoch auch zu unerwünschten Veränderungen der Bindungseigenschaften führen. Daher sollten nur ausgewählte, genau definierte Positionen des Aptamers modifiziert werden. Dieses Problem lässt sich vermeiden, indem man die Modifikationen präselektiv bereits in der Nukleinsäurebibliothek einführt. Hierbei muss gewährleistet sein, dass die modifizierten Basen von den während der SELEX verwendeten Enzymen (DNA- bzw. RNA-Polymerasen) toleriert werden.

Aptamere lassen sich sowohl aus RNA- als auch aus DNA-Bibliotheken selektieren. Dabei besitzt RNA eine Hydroxylgruppe mehr als DNA, wodurch in RNA-Oligonukleotiden stärkere Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken-Bindungen möglich sind. Dennoch liegen die Dissoziationskonstanten für RNA- und DNA-Aptamere in der gleichen Größenordnung. DNA-Aptamere sind weniger nukleaseanfällig und wurden bereits in biologischen Flüssigkeiten erfolgreich eingesetzt. [54, 62] RNA ist hingegen vor allem anfällig für endogene Ribonukleasen, die sich üblicherweise in Zelllysaten oder Serum befinden. In biologischen Proben ist die Lebensdauer von RNA typischerweise unter 10 min. [116] Dennoch wurden auch RNA-Aptamere bereits zur Detektion ihrer Targets in komplexen Proben verwendet. [107] Durch Verwendung von 2'-O-Methyl oder 2'-Fluoro-modifizierter RNA oder den Zusatz von Ribonukleaseinhibitoren können die Probleme der Degradierung von RNA-Aptameren umgangen werden. [17] Auch durch Modifikationen an der 2'-Position des Zuckers können Oligonukleotide RNase resistent werden. [63, 126] Da in biologischen Flüs-

sigkeiten überwiegend Pyrimidin-spezifische Endonukleasen vorkommen, schützen Substitutionen der 2' Position von Pyrimidin mit NH<sub>2</sub> oder F als Substrat in der SELEX vor der Degradierung. [70, 73, 93]

Ein anderer Ansatz zu Herstellung nukleaseresistenter Aptamere ist die Selektion von Aptameren gegen das Enantiomer des Zielmoleküls. Das zu der so selektierten Sequenz spiegelbildliche Aptamer wird Spiegelmer genannt und bindet an das eigentliche Target. Da es sich bei dem Spiegelmer um ein in der Natur nicht auftretendes Molekül handelt, kann es von den natürlich vorkommenden Enzymen nicht erkannt und folglich nicht abgebaut werden. [82, 114]

### 1.1.2. Targets

Einzelsträngige Oligonukleotide können eine Vielfalt von sekundären und tertiären Strukturen ausbilden, [7] wobei die Vielfalt der strukturellen Motive von Oligonukleotiden der einer gleichlangen Peptidsequenz bei weitem überlegen ist. Die Nukleotide können miteinander durch kanonische Watson-Crick- und ungewöhnliche Basen-Paarung interagieren. Als Targets kommen für Aptamere nicht nur komplexe Strukturen wie Proteine, sondern auch niedermolekulare Targets in Frage. [37] Als niedermolekulare Targets wurden z. B. bereits Metallionen, [65] Vitamine, [95, 155] organische Farbstoffe, [33, 34, 37] verschiedene pharmazeutische Wirkstoffe, [72, 102] Aminosäuren, [51, 22, 37] Antibiotika, [37] Nukleotide [68, 37] und Peptide [113] erfolgreich eingesetzt. Auch gegen eine Reihe von Protein-Targets wurden Aptamersequenzen veröffentlicht.[40] Dabei wurden verschiedene Proteinklassen wie z.B. Enzyme,[159, 156, 84] Wachstumsfaktoren,[70, 117, 71] Antikörper [58] und Zelladhäsionsmoleküle [73] als Targets verwendet. Darüber hinaus wurden auch Aptamere gegen intakte Viren publiziert.[118]

Sequenzinformationen einer Vielzahl von Aptameren sind über die Aptamer Database online <sup>1</sup> frei verfügbar. [90]

## 1.2. Eigenschaften von Aptameren

### 1.2.1. Aptamere und Antikörper im Vergleich

Aptamere finden in bisher von Antikörpern dominierten Anwendungen immer mehr Verwendung und weisen im Vergleich zu Antikörpern eine Reihe von Vorteilen auf. Während die Antikörperidentifizierung abhängig von Tieren oder Zelllinien ist, werden Aptamere durch einen *in vitro* Prozess entwickelt und vollsynthetisch hergestellt. Dadurch können Aptamere auch gegen toxische oder nicht immunogene Substanzen entwickelt werden, gegen die Antikörper nicht oder nur schwer darstellbar sind. [69] Die im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen entwickelten Antikörper sind auch in ihren Anwendungen auf physiologische Bedingungen angewiesen, um ihre Aktivität beizubehalten. Bei Aptameren können hingegen während der SELEX die Selektionsbedingungen variiert werden und somit Aptamere entwickelt werden, die ihr Target unter den gewünschten Assaybedingungen (Puffer, pH, Ionenstärke, Temperatur) erkennen. Die Produktion

<sup>1</sup><http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.

Tabelle 1.1.: Unterschiede zwischen Aptameren und Antikörpern.

Antikörper	Aptamer
Entwicklung und Herstellung in Tieren oder Zellkultur. Nicht für alle Targets möglich.	Entwicklung durch einen <i>in vitro</i> Prozess macht auch toxische und nicht immunogene Targets zugänglich.
Eigenschaften unterliegen aufgrund des <i>in vivo</i> Herstellungsverfahrens Chargenschwankungen.	Durch chemische Synthese in hoher Reproduzierbarkeit herstellbar.
Werden unter physiologischen Bedingungen entwickelt und benötigen diese Bedingungen auch, um ihre Aktivität beizubehalten.	Selektionsbedingungen können an die gewünschten Assay-Bedingungen angepasst werden.
Sind temperaturempfindlich und können irreversibel denaturieren.	Die Denaturierung von Nukleinsäuren ist reversibel.
Begrenzte Haltbarkeit, Regeneration kann zu Aktivitätseinbußen führen.	Lange Haltbarkeit, Regeneration möglich.
Modifizierung nicht an definierten Positionen möglich, kann die Aktivität beeinflussen.	Einbau von Reportermolekülen und anderen Modifikationen an definierten Positionen möglich.
Kinetische Parameter nicht veränderbar.	Kinetische Parameter können angepasst werden.
Antikörper der IgG Klasse sind bivalent. Molekulargewicht ca. 150 kDa.	Meistens monovalent. Molekulargewicht ca. 13 - 26 kDa (40 - 80 nt).

monoklonaler Antikörper in Hybridomzellen benötigt kosten- und energieintensive Zellkulturtechniken und die Entwicklung von Antikörper-produzierenden Zelllinien geht mit einem enormen Screening-Aufwand einher. Darüber hinaus muss jede Charge aufgrund des biologischen Herstellungsverfahrens einer zeitaufwändigen Qualitätskontrolle unterworfen werden, um reproduzierbare Antikörpereigenschaften zu gewährleisten. Bei der vollsynthetischen Herstellung von Aptameren kommt es hingegen nur zu geringen Batch-zu-Batch-Schwankungen. Die Unterschiede zwischen Aptameren und Antikörpern werden in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Aptamere sind weitaus kleiner als Antikörper. Als Nukleinsäuren benötigen sie nur eine Abfolge von relativ wenigen Nukleotiden, um durch Watson-Crick Interaktionen eine stabile dreidimensionale Struktur, die Voraussetzung für die molekulare Erkennung ist, auszubilden.[104] Bei Antikörpern erfolgt die Interaktion zwischen den Aminosäuren hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen, welche wesentlich schwächer sind. Somit sind sehr lange Aminosäuresequenzen notwendig, um eine stabile Struktur mit Bindungstaschen auszubilden.[104] Die meisten Aptamere sind zwischen 40 und 80 nt lang, daraus ergibt sich bei einer durchschnittlichen Nukleotidmasse von 325 Da ein Molekulargewicht von ca. 13 - 26 kDa. Die geringe Größe der Aptamere führt auch dazu, dass sie sich an einer Oberfläche in größerer Dichte immobilisieren lassen, wodurch der Assay einen großen dynamischen Bereich erhält. [106] Dieser Vorteil dürfte allerdings nur für Aptamere ge-

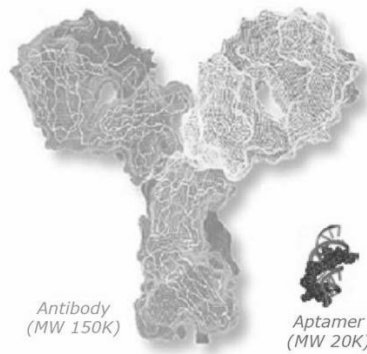


Abbildung 1.3.: Antikörper und Aptamere im Größenvergleich. Quelle: www.NascaCell.de.

gen kleine Targets bestehen, da es bei großen Protein-Targets eher zu einer sterischen Limitierung durch den Raumanpruch der Targets selbst kommen dürfte. So wurden von Stadtherr et al. (2005) ein Antikörper und ein Aptamer gegen Thrombin verglichen und es zeigte sich, dass bei Immobilisierung von Aptameren sich die Signal-Sättigung nicht zu höheren Analyt-Konzentrationen verschieben lässt. [152]

In ihrer Affinität und Spezifität gegenüber dem Target sind viele Aptamere Antikörpern ebenbürtig oder übertreffen diese sogar, [50] es wurden bereits Aptamere mit nanomolaren bis picomolaren Bindungskonstanten publiziert. [129]

### 1.3. Interaktion mit dem Target / Faltungsmechanismen

Die Interaktion eines Aptamers mit seinem Target beruht auf molekularer Erkennung und hängt somit eng mit der dreidimensionalen Faltung des Aptamers zusammen. Dabei sind prinzipiell zwei verschiedene Mechanismen denkbar: Die adaptive Bindung sowie die Bindung nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip. Bei der adaptiven Bindung bildet das Oligonukleotid auch in Abwesenheit des Targets Strukturen (Stämme und Loops) aus, die für die Bindung des Liganden notwendig sind. Diese partiell strukturierten Oligonukleotide können in Lösung jedoch ihre Konformation beständig ändern. Die „vorgeformten“ Strukturelemente bilden in Abwesenheit des Liganden also keine stabile Tertiärstruktur aus. Der Ligand initiiert dann die Ausbildung der notwendigen dreidimensionalen Struktur des Aptamers. [119, 60] Auch die *Aptamer Beacons* [115] deuten darauf hin, dass es sich bei der Erkennung zwischen Aptamer und Target um einen *Induced Fit*-Mechanismus handelt, d.h., dass sich die Struktur erst in Anwesenheit des Targets ausbildet. Bei den *Aptamer Beacons* führt die Targeterkennung zu einer Konformationsänderung des Aptamers, welche als Fluoreszenzsignal ausgelesen werden kann (siehe Abb. 1.4).

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass natürlich vorkommende RNA komplexe Bindungstaschen auch in Abwesenheit des Liganden ausbildet. [155] Es ist also möglich, dass das Aptamer bereits in Abwesenheit des Targets die zur Bindung erforderliche Faltung einnimmt und dann in einem „Schlüssel-Schloss“ analogen Mechanismus mit dem Target in Wechselwirkung tritt. In der Literatur gibt es Hinweise für beide Bindungsmechanismen. So bildet das Thrombin Aptamer auch in Abwesenheit von Thrombin eine geordnete Struktur aus, während viele andere Aptamere (z.B. FMN-RNA-Aptamer, ATP-RNA-Aptamer,

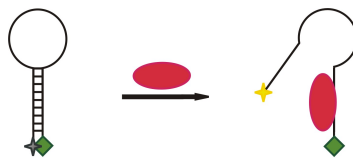


Abbildung 1.4.: Funktionsprinzip eines *Aptamer Beacons*. In Abwesenheit des Targets (rote Ellipse) befinden sich Fluorophor (Stern) und *Quencher* (grünes Quadrat) in unmittelbarer Nähe zueinander. Durch die Bindung des Targets wird der Stamm geöffnet, Fluorophor und *Quencher* entfernen sich voneinander, es wird ein Fluoreszenz-Signal emittiert.

Arginin-RNA-Aptamer) diese Struktur erst in Gegenwart des Targets ausbilden. [45] Vermutlich weisen verschiedene Aptamere also keinen einheitlichen Bindungsmechanismus auf. Sowohl bei der adaptiven Bindung als auch bei der Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erfolgt die Targetbindung über van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen. [124] Aptamere können neben den üblichen kanonischen Basenpaaren auch *Mismatch*-Paarungen (G.G und G.A) und Triplets (U.(A.U) und G.(U.A)) zur Strukturausbildung heranziehen. [119] Darüber hinaus kann nicht nur das Aptamer sondern auch das Target während der Komplexbildung konformative Veränderungen erfahren. [119]

Wiederholt gibt es in der Literatur Hinweise auf die Ionenabhängigkeit der Aptamer-Target-Bindung. Gebhardt et al. (2000) entwickelten und untersuchten ein Aptamer gegen S-Adenosylhomocystein (SAH) und berichten, dass bivalente Ionen ( $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ ) die aktive Konformation des Aptamers stabilisieren. [50] Für RNA sind die Faltungsmechanismen und insbesondere die Ionenabhängigkeit der Faltung gut untersucht. Die negative Ladung der Oligonukleotide wirkt dabei der Faltung in eine kompakte Struktur entgegen. Kationen vermindern diese Abstoßung und begünstigen somit die Faltung. Vor allem  $Mg^{2+}$  wirkt stabilisieren auf die Tertiärstruktur. [28]

In der molekularen Erkennung bedeutet eine hohe Affinität ein hohes Maß an Komplementarität der Oberflächen der zwei beteiligten Moleküle. Die Bindungen weisen dabei elektrostatische und hydrophobe Anteile sowie Wasserstoffbrückenbindungen auf. Diese "Oberflächenkomplementarität" von Struktur und Ladungsverteilung beeinflusst auch die Spezifität, so dass hoch affine Aptamere ebenfalls hoch spezifisch binden sollten. [31]

### 1.3.1. Aptamere gegen niedermolekulare Targets

Vor allem die Strukturen von Aptameren gegen niedermolekulare Targets (z. B. Adenosin, Arginin, Flavin) [104] wurden bisher untersucht. Dabei scheinen planare Chromophore (AMP, FMN) durch Interkalation in die Aptamerstruktur gebunden zu werden. Andere kleine Targets wie z.B. L-Arginin werden dagegen vom Aptamer vollständig umhüllt. Die molekulare Erkennung wird dabei bestimmt durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. [119] Diese Wasserstoffbrückenbindungen werden von polaren Basen gebildet, die die Aptamer-Bindungstaschen umgeben. Die räumliche Anordnung dieser polaren Gruppen innerhalb der Bindungstasche ist auch für die Diskriminierung sehr ähnlicher Targets verantwortlich. [119, 60]



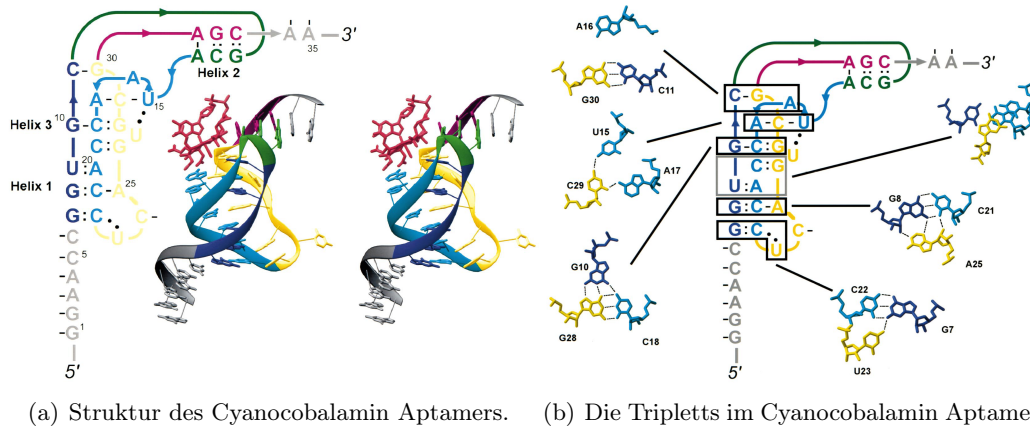


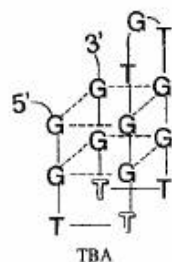
Abbildung 1.5.: Das Cyanocobalamin Aptamer. (a) Stränge, die die Triplex formen sind in dunkelblau, cyan und gelb dargestellt, die Stränge die die Duplex ausbilden grün und magenta. Cyanocobalamin ist in rot dargestellt. (b) Detaillierte Darstellung der Basen-Triplets. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den drei Basen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Quelle: Sussman et al.(2000). [155]

Ausführlich untersucht wurde der Faltungs-/Bindungsmechanismus auch für das anti-Cyanocobalamin Aptamer. [155] Hier liegen offensichtlich im Aptamer bereits vorstrukturierte Bereiche (eine RNA Triplex und ein *Three Stranded Zipper*) vor. Durch Annäherung dieser Strukturelemente entsteht eine Furche, welche die Bindungsstelle für das Cyanocobalamin (Vitamin B12) bildet. Dabei faltet sich das Aptamer in eine *Pseudoknot* Form, bei der die erste Helix in eine größere Triplex eingebettet ist. Senkrechte Anordnung der Triplex und der Helix bildet die Bindungs-Seite aus. Bei diesem Aptamer sind also Faltung und Bindung zwei unterschiedliche Ereignisse, wodurch der Mechanismus der Bindung eher einer typischen Protein-Ligand-Bindung ähnelt und keine adaptive Bindung vorliegt.

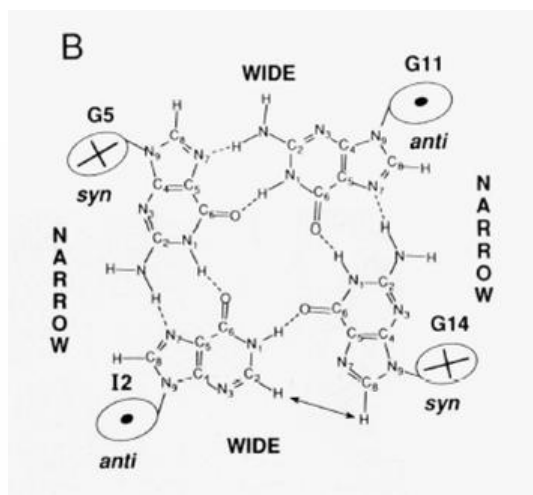
Das *Pseudoknot* Motiv, das im Cyanocobalamin Aptamer vorkommt, scheint in Aptameren ein häufiges Motiv zu sein. Diese Struktur wurde auch für ein Aptamer gegen Biotin berichtet. [168] Dabei bindet das Biotin in einer Bindungstasche an der Schnittstelle zweier Helices.

### 1.3.2. Aptamere gegen komplexere Protein-Targets

Die Untersuchung der Strukturen von Aptameren gegen Protein-Targets ist bisher noch recht lückenhaft. Eines der wenigen gut charakterisierten Aptamere ist das Aptamer gegen Thrombin. Das DNA Aptamer gegen Thrombin [13] besitzt die Sequenz GGTTGGTTG-TGGTTGG und inhibiert Thrombin mit der Folge, dass die Gerinnungszeiten wesentlich erhöht werden. Vermutlich bindet das Aptamer dabei an die *exo*-Site des Thrombins. [166] Aus der Sequenz wird ersichtlich, dass es in diesem Aptamer keine Watson-Crick Basenpaare gibt. Dennoch konnten Wang et al. (1993) [167] die dreidimensionale Struktur des Aptamers mittels NMR aufklären. Das Aptamer nimmt eine kompakte, hoch-symmetrische Form ein und bildet in Lösung eine unimolekulare Quadruplex-Struktur aus. [97, 111, 103] Die DNA Quadruplex besteht dabei aus zwei G-Quartetts, die durch zwei TT-Loops und einen TGT-Loop überspannt sind. Die Basen innerhalb der Quartetts stehen alternierend



(a) Struktur von TBA.



(b) Struktur eines G-Quartets.

Abbildung 1.6.: Struktur des anti-Thrombin Aptamers (*Thrombin Binding Aptamer*, TBA). (a) Anordnung der Quartetts zueinander. (b) Detaillierte Darstellung der Bindungen innerhalb eines G-Quartetts. Quelle: Macaya et al. (1993). [97]

syn- und anti- zueinander. Es werden zwei weite und zwei enge Furchen gebildet, die beiden engen Furchen werden von den TT-Loops überspannt, auf der anderen Seite der Quadruplex überspannt der TGT-Loop eine der weiten Furchen. [97] Das G-Quartett-Motiv ist bereits schon länger für G-reiche Nukleinsäuresequenzen bekannt. Es bildet sich dabei vor allem in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  aus. [76] Auch das Thrombin-Aptamer wird durch  $\text{K}^+$  stabilisiert. Dabei ist dieser stabilisierende Effekt vor allem bei höheren Temperaturen zu beobachten, während bei niedrigen Temperaturen die Quadruplexstruktur auch in Abwesenheit von  $\text{K}^+$  thermodynamisch stabil ist. [5] Die Anwesenheit von kurzen Loops und nicht kanonischen Basenpaarungen in Aptameren erschwert die Anwendung von Standardmethoden zur Bestimmung der Struktur und ist somit als eine Ursache dafür zu sehen, dass bisher nur wenige Aptamerstrukturen untersucht und veröffentlicht wurden. [45]

Aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität ( $T_M$  größer als  $50^\circ\text{C}$ ) und der hohen kinetischen Stabilität (die Imino-Protonen besitzen Austauschzeiten von Monaten) wird angenommen, dass sich die Struktur des anti-Thrombin-Aptamers durch die Bindung seines Targets nicht ändert. [166] Dieses Aptamer wäre demnach ein Beispiel für ein Aptamer, welches sein Target nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip bindet.

Andere Aptamere ändern ihre Struktur während der Targetbindung. Darüber hinaus kann nicht nur die Struktur des Aptamers sondern auch die Struktur des Target-Proteins durch das Bindungsereignis geändert werden. So berichten Balasubramanian et al. (1998), dass Interferon durch Bindung an ein Aptamer seine Sekundär- und Tertiärstruktur verändert. [4] Andere Proteine werden durch die Bindung an das Aptamer in ihrer Struktur jedoch nicht verändert, wie z. B. das MS2-coat Protein. [60]

### 1.3.3. Vergleich der Aptamer-Target Bindung mit der Protein-Target-Bindung

Die oben aufgeführten Beispiele deuten an, dass es für Aptamere keinen einheitlichen Mechanismus der Faltung und Target-Bindung gibt. Während das freie anti-Thrombin Aptamer in Lösung bereits eine genau definierte Struktur einnimmt, gilt dies für viele andere Aptamere nicht. Noch komplizierter wird die Situation dadurch, dass die Vorhersage von Aptamer-Strukturen schwierig ist, da die geringe Diversität der vier Grundbausteine in Kombination mit der starken Interaktion zwischen den Basen eine Strukturvorhersage für eine bevorzugte Sekundär- und Tertiär-Struktur schwierig macht. Dieses Problem ist für RNA bereits länger als „*RNA Folding Problem*“ bekannt. [59] Für eine einzige Sequenz ergibt sich ein ganzer Satz an möglichen Faltungen, und nach den Gesetzen der Thermodynamik koexistieren oft mehrere Strukturen. Dennoch lassen sich im Vergleich zum besser untersuchten Bindungsverhalten der Proteine folgende generelle Überlegungen anstellen: Die Bindungstaschen in Aptameren sind im Vergleich zu denen in Proteinen vergleichsweise kompakt, da in Nucleinsäuren enge Watson-Crick-Paarung vorherrschen, während bei Proteinen die Interaktionen auf schwächere hydrophobe Wechselwirkungen zurückgehen. [104] Daraus geht auch hervor, dass Nucleinsäuren relativ wenige Nucleotide benötigen, um stabile Bindungstaschen auszuformen. Proteine benötigen dafür eine größere Anzahl von Aminosäuren, da die hydrophoben Wechselwirkungen weniger geordnet und gerichtet sind als Watson-Crick Basenpaarungen. Daher benötigen Proteine im Allgemeinen einen globulären Kern zur Ausbildung stabiler Strukturen und Bindungstaschen. Aus der im Vergleich zu Proteinen relativ starren Struktur der Nucleinsäuren ergibt sich auch, dass sie einen Liganden mittels Wasserstoffbrückenbindung nur über relativ wenige Vektoren erreichen können, während Proteine einen Liganden besser umhüllen. Daher kann vermutet werden, dass Aptamere Bindungstaschen formen, deren Konturen weniger genau zum Liganden „passen“ als die entsprechenden Strukturen bei Proteinen. [104, 60]

Der Schlüssel zur molekularen Erkennung der Targets durch Aptamere liegt in der Vielfalt der Interaktionen. Dazu gehören präzises *Stacking* der Basen in der Nucleinsäure, die dem Aptamer Stabilität verschafft, die spezifische Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Nucleinsäure, die Komplementarität der molekularen Oberflächen von Ligand und Aptamer sowie auch eine Komplementarität der Ladungsverteilung auf diesen Oberflächen. [60] Für die meisten Aptamere ist die Umhüllung großer Teile des Liganden charakteristisch. Dabei spielen häufig die ungepaarten Loop-Regionen des Aptamers eine entscheidende Rolle. Diese Regionen nehmen während des Prozesses der adaptiven Bindung eine definierte Konformation an und faltet sich häufig um den Liganden herum. [60] Die große Kontaktfläche zwischen Aptamer und Target erlaubt somit eine Vielzahl von intermolekularen Kontakten, die zur Diskriminierung verschiedener Liganden führen kann. Die Art der Diskriminierung hängt dabei von unterschiedlichen Faktoren ab. So kann es zwischen dem Aptamer und einem „nicht optimalen Target“ zu sterischen Hinderungen kommen. Auch die sehr spezifische Anordnung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Bindungstaschen trägt zur Diskriminierung bei, ebenso wie die Komplementarität der Oberflächenladungen. [60]

## 1.4. Anwendungen von Aptameren

Aptamere lassen sich in der Forschung vielfältig einsetzen in allen Anwendungsbereichen, die auf molekularer Erkennung beruhen und dienen hier als Ersatz für herkömmlicherweise als Fänger- oder Detektionsmoleküle verwendete Antikörper. [69] Dies schließt verschiedene diagnostischen und therapeutischen Applikationen ebenso wie analytische Methoden ein. [19, 171]

### 1.4.1. Medizinische und diagnostische Anwendungen

Aptamere können z.B. in der Target-Validierung zur Bestimmung der Relevanz eines Proteins im Kontext einer bestimmten Krankheit verwendet werden. [15, 124, 10] Dabei wird - anders als bei herkömmlichen Ansätzen - nicht auf der DNA-Ebene (*Gene Knock Out*) oder RNA-Ebene (RNAi) gearbeitet, sondern das zu untersuchende Protein selbst auf Proteomebene durch *in vivo* Inhibierung durch ein Aptamer ausgeschaltet. [124, 43] Die DNA *Knock Out* Strategien liefern darüber hinaus nur einen limitierten Hinweis auf die funktionellen Zusammenhänge des Proteins in der Krankheitsentstehung, da der Zusammenhang zwischen Gen und Funktion unvollständig ist. Der Einsatz von Antikörpern in der Target-Validierung ist dadurch erschwert, dass im Zellinneren reduzierende Bedingungen herrschen, die zur Denaturierung der Antikörper führen. Intrazelluläre Targets sind also durch Aptamere besser zugänglich als durch Antikörper. [129]

Auch als Arzneimittel stellen Aptamere viel versprechende Kandidaten dar. Bei der Entwicklung von Therapeutika werden üblicherweise Antagonisten gesucht. Damit ein Aptamer als Therapeutikum eingesetzt werden kann, muss es also an das Target-Protein binden und dabei eine spezielle Funktion dieses Proteins inhibieren. Als Therapeutika bieten sich Aptamere vor allem an, da sie nicht immunogen sind und eine geringe bis keine Toxizität besitzen. [124] Als kleine Moleküle (5-25 kDa) werden Aptamere schnell ausgeschieden. Durch Modifikation, z.B. mit Cholesterol oder Polyetylen-Glycol (PEG) kann die Bioverfügbarkeit und die Pharmakokinetik der Aptamere jedoch gesteuert werden. Aufgrund der geringen Größe sind sie wenig immunogen und weisen außerdem Ähnlichkeiten mit endogenen Molekülen auf. Zur Behandlung von Maculardegeneration wird das aptamerbasierte Medikament Macugen<sup>TM</sup> (Pegaptanib) von Eyetech Pharmaceuticals, welches VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) inhibiert, eingesetzt und ist seit 2004 von der FDA zugelassen. [120]

Interessant ist außerdem der Ansatz, dass neben dem Aptamer-Therapeutika gleichzeitig ein Antidot zu diesem Medikament zur Verfügung steht, dessen Basenabfolge zu der des Aptamers komplementär ist und welches der Aptamerwirkung durch Watson-Crick Basenpaarung entgegenwirkt. [140, 158, 38] Dies ermöglicht eine genaue Einstellung der physiologischen Situation und schnelle Gegenmaßnahmen im Falle einer Überdosierung. Außerdem ist es möglich, Aptamere so zu selektieren, dass die Bindung an das Target und somit die Inhibierung des Proteins durch Zugabe eines Liganden (*Inducer*) gelöst wird. [165] Auch dieser Ansatz ermöglicht eine direkte Kontrolle über die Proteinfunktion durch gezieltes Eingreifen auf der Proteomebene.

Aptamere werden auch im Bereich *Drug Discovery* eingesetzt. [53] Dabei wird zunächst ein Aptamer gegen ein geeignetes krankheitsrelevantes Protein-Target generiert. Dieses Aptamer bindet an das Target und inhibiert dabei dessen Funktion. Nun wird dieser Aptamer-Target-Komplex zum Screening nach geeigneten niedermolekularen Medikamenten genutzt. Dazu wird der Komplex aus Aptamer und Target in Hochdurchsatz-Screening-Assays verschiedenen niedermolekularen Substanzen ausgesetzt und es wird nach solchen Substanzen gesucht, die das Aptamer aus dem Komplex verdrängen und dabei ebenfalls eine inhibierende Wirkung ausüben. [41, 53]

Mit Hilfe von Aptameren lassen sich auch Funktionsstudien durchführen. Dazu werden Aptameren *in vivo* exprimiert. [11, 16, 42] Diese so genannten Intramere [39] können in größere RNA-Konstrukte eingebaut werden, wodurch ihre intrazelluläre Stabilität steigt und die Aptamere gezielt zu bestimmten Zellkompartimenten gelenkt werden können. [67] Intramere erlauben somit das Studium von Proteinfunktionen in ihrer natürlichen Umgebung *in vivo*. Bei *in vivo* Assays ermöglicht die geringe Größe von Aptameren sowohl die schnelle Aufnahme ins Gewebe als auch die schnelle Abführung nicht gebundener Aptamere, wodurch eine hohe *Signal to Noise Ratio* (SNR) erreicht wird. [61]

#### 1.4.2. Aptamere in der Biotechnologie

Aptamere konkurrieren mit Antikörpern in vielen analytischen Anwendungen, z.B. in der Protein Blot Analyse und in ELISA-analogen Anwendungen zur Detektion von Proteinen, [112] dabei sind auch Kombinationen von Antikörpern und Aptameren als Fänger- und Detektionsmoleküle möglich. [116] Außerdem existieren bereits eigene Aptamer-basierte Formate wie z.B. der ELONA (*Enzyme Linked Oligonucleotide Assay*) [30] und ELAA (*Enzyme Linked Aptamer Assay*) sowie gemischte ELAA/ELISA Formate. [5] Es ist auch ein rein aptamerbasierter Sandwich-Assay denkbar, bei dem Aptamere sowohl als Fänger- als auch als Detektions-Molekül eingesetzt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die beiden verwendeten Aptamere unterschiedliche Bindungsstellen des Targets erkennen und die Struktur des Targets durch die Bindung des ersten Aptamers nicht zu stark beeinträchtigt wird. Wünschenswert wäre in diesem Zusammenhang die Selektion von Aptameren, welche den Aptamer-Target-Komplex erkennen. Dies betrifft zum einen kleine Targets, welche vom Aptamer zum großen Teil eingehüllt werden, so dass kaum noch Oberfläche für die Bindung eines zweiten Aptamers zur Verfügung steht. [69] Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Aptamere die Struktur des Targets durch die Bindung verändern können. [4] Auch in diesen Fällen wäre ein Aptamer gegen den Aptamer-Target-Komplex von Vorteil.

Auch in der Affinitätschromatographie wurden Aptamere bereits erfolgreich zur Aufreinigung von Proteinen und anderen Targets verwendet. [137, 26, 88, 112] Dabei weisen Aptamere im Vergleich zu Antikörpern den Vorteil auf, dass milde Elutionsbedingungen gewählt werden können, wodurch die Funktion des aufgereinigten Proteins erhalten bleibt. Zudem können Aptamere ohne oder mit nur geringem Verlust ihrer Aktivität regeneriert werden, wodurch aptamerbasierte Chromatographiemedien mehrfach verwendet werden können.

### 1.4.3. Aptamere in der Sensorik

Ein breites Anwendungsfeld für Aptamere eröffnet sich durch ihren Einsatz als Biokomponente in so genannten „Aptasensoren“. [116] Dabei lassen sich Aptamere in hoher Dichte und unter Erhalt ihrer Funktion immobilisieren. [44] Ein besonderer Vorteil der Aptamere in der Biosensorik ist ihre Regenerierbarkeit (siehe Tabelle 1.2 auf Seite 88). [171] Als Methoden zur Regenerierung von Aptameren wurden bereits Hitzebehandlung, Erhöhung der Salzkonzentration, pH-Shift sowie die Zugabe von Chelatbildnern erfolgreich eingesetzt. Alle Parameter außer dem pH Wert können dabei nahezu beliebig verändert werden, ohne dass das Aptamer beschädigt wird. Außerdem lassen sich in Aptameren Modifikationen zur gezielten Immobilisierung an definierten Positionen innerhalb der Aptamersequenz einführen und das Labeling mit Reportern erleichtert die Detektion. Bei den so genannten *Signaling Aptamers* [115] kann sogar auf ein Detektionsreagenz vollständig verzichtet werden. Bei diesem *Reagentless Biosensor* führt eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Aptamers während des Bindungsereignisses dazu, dass die Bindung detektiert wird. Dazu wird ein Fluorophor in einer Region des Aptamers positioniert, die während der Bindung des Targets konformativen Veränderungen unterliegt, das Bindungsereignis kann als Änderung der Fluoreszenzintensität ausgelesen werden. [75] Ein weiteres Beispiel für *Signaling Aptamers* sind die *Molecular Beacons*. [57, 132] *Molecular Beacons* bestehen aus einem Loop und einem Stamm. Die Target-Erkennungssequenz befindet sich im Stamm des Aptamers, an dessen Enden jeweils ein Fluorophor und ein Quencher angeordnet sind. Die Bindung zum Target bewirkt eine Konformationsänderung bei der sich Fluorophor und Quencher voneinander entfernen, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht (vgl. Abb. 1.4 auf Seite 78). Die Verwendung von *Molecular Beacons* ermöglicht somit auch die Detektion eines Targets in homogener Lösung. [131]

Im Gegensatz zu Antikörper- oder DNA-basierten Assays kristallisiert sich für Aptamer-Assays immer mehr heraus, dass es keine einheitlichen Empfehlungen für die Assay-Bedingungen gibt. [5] Obwohl es sich bei Aptameren chemisch betrachtet um Nukleinsäuren handelt, müssen sie - ebenso wie Antikörper - eine definierte dreidimensionale Struktur annehmen, um zur Bindung ihres Targets befähigt zu sein. Da es jedoch keinen einheitlichen Bindungsmechanismus gibt (vgl. Abschnitt 1.3) und darüber hinaus Aptamere häufig unter unterschiedlichen Bedingungen selektiert werden und diese Selektionsbedingungen Einfluss auf die späteren Assaybedingungen haben, ist es für jedes Aptamer notwendig, die optimalen Assaybedingungen empirisch zu bestimmen. Dazu gehören die Immobilisierungsstrategie, die Inkubationszeit mit dem Target ebenso wie die Temperatur und die Pufferzusammensetzung. [5]

Eine Reihe von Aptamer-basierten Sensorsystemen wurde bereits entwickelt und publiziert (Tabelle 1.2 auf Seite 88). Dabei konnten Aptamere in den unterschiedlichsten Sensortypen erfolgreich eingesetzt werden.

### 1.4.4. Aptamer-basierte Microarrays

Bereits im Jahr 1999 waren DNA-Microarrays ein standardisiertes Verfahren, um Expressionsmuster auf RNA-Ebene zu untersuchen, wodurch die eigentlichen Genfunktionen auf-

geklärt werden sollten. Da der mRNA Level jedoch keine genaue Aussage über den Protein Level zulässt und keinen Einblick in die posttranslationalen Modifikationen der Proteine ermöglicht, gibt es heute Bestrebungen, die Microarray-Technik auf das Proteom auszuweiten. Hierbei werden bisher hauptsächlich Antikörper als Fängermoleküle verwendet. Aptamere bieten als Fängermoleküle in Protein-Microarray-Anwendungen eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern. Als Nukleinsäuren lassen sie sich einfach modifizieren und gezielt immobilisieren. Sie sind robust und zeichnen sich durch eine lange Haltbarkeit aus. Im Gegensatz dazu werden Antikörper auf Microarray-Substraten häufig ungerichtet und heterogen gebunden oder können auf der Microarray-Oberfläche denaturieren. Die Aptamerselektion ist schnell und automatisierbar und bei der Immobilisierung von Aptameren kann auf Techniken aus der DNA-Microarray-Technologie zurückgegriffen werden. Ein weiterer Vorteil von Aptameren als Fängermolekülen in der Protein-Microarray-Technologie besteht darin, dass verschiedene Aptamere gegen ein Target entwickelt werden können. Um möglichst geringe Targetkonzentrationen detektieren zu können, sollten möglichst hoch affine Aptamere verwendet werden. Wenn die Konzentration des Targetproteins jedoch über einen weiten Bereich variiert, ist es sinnvoll, mehrere Aptamere mit unterschiedlichen Affinitäten auf einem Microarray zu verwenden. Dadurch kann der dynamische Bereich des Microarrays maximiert werden. [20]

Aufgrund dieser Vorteile vermutete Jayasena bereits 1999, dass Aptamer-basierte Protein-Microarrays zeitnah zu einem entscheidenden Tool im Bereich der Proteomik werden würden: [69]

*„In the near future, aptamer microarrays are expected to play a dominant role in the area of proteomics. . . It is reasonable to expect that microarrays generated by aptamers . . . will make inroads to proteomics in the near future.“*

Bis heute ist man davon jedoch noch weit entfernt. Um wirkliche Proteomanalyse betreiben zu können, ist ein komplettes Set von Aptameren gegen jedes signifikante Protein eines Organismus notwendig. Zusätzlich sind Aptamere wünschenswert, die zwischen unterschiedlichen Proteinmodifikationen unterscheiden können. Eine solche Fülle an Aptameren wurde jedoch bis heute nicht entwickelt. Außerdem erscheint eine direkte Übertragung von Techniken aus der DNA-Microarray-Technologie zur Entwicklung von Aptamerarrays nicht ohne weiteres möglich. Aptamere müssen nicht nur auf einer Chipoberfläche immobilisiert werden, sie müssen darüber hinaus auch eine definierte dreidimensionale Struktur einnehmen. So können Aptamere, die in Lösung eine hohe Affinität gegenüber ihrem Target aufweisen, auf einer Oberfläche immobilisiert nicht mehr funktionstüchtig sein. Darüber hinaus muss die Bindungskinetik für jedes Aptamer einzeln bestimmt werden. Während für Genexpressionarrays die Hybridisierungskinetik zwischen dem immobilisierten Oligonukleotid und der korrespondierenden cDNA aufgrund der Sequenzübereinstimmung (Komplementarität) vorhergesagt werden kann, muss die Kinetik von Aptamer-Protein-Bindungen empirisch bestimmt werden. [20] Die Assay-Bedingungen unter denen Aptamere ihre Funktionalität entfalten sind abhängig von ihren Selektionsbedingungen wie z.B. Puffer und Temperatur während der SELEX. So ist es schwierig, Aptamere, die unter unterschiedlichen Bedingungen selektiert wurden auf einem Chip unter Erhalt ihrer Aktivität zu vereinen. [18]

Aufgrund dieser Schwierigkeiten steht die Entwicklung von Aptamer-basierten Assays noch

am Anfang und die Proteomforschung auf Basis von Aptamer-basierten Microarrays liegt noch in weiter Ferne. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über den heutigen Stand der Forschung auf dem Gebiet der Aptamer-basierten Detektion von Proteinen im Microarray-Format.

### Publizierte Aptamer-basierte Microarrays

Bis heute wurden lediglich wenige Aptamer-basierte Microarrays publiziert. Dabei wurden häufig eher exotische Formate verwendet. So publizierten Kirby et al. (2004) einen „*Chip based Microsphere Array*“ bei dem Aptamere an *Beads* immobilisiert wurden. Diese *Beads* wurden in Mikro-*Wells* einer Flußzelle positioniert. [80] Auch eine Reihe von aptamerbasierten Faser-optischen Microarrays wurde bereits veröffentlicht. [91] Auch die Verfahren zu Detektion des Bindungsereignisses gestalten sich in der Literatur recht unterschiedlich. So verwendeten McCauley et al. (2003) z. B. Fluoreszenz Anisotropie zur Detektion von Proteinen. [107]

In der DNA-Microarray-Technologie hat sich dagegen ein einheitliches Format durchgesetzt. Hier wird ein planares Glas-Substrat mit an definierten Positionen („Spots“) immobilisierten Fängermolekülen verwendet. Zur Detektion werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Eine Adaption der Aptamer-basierten Microarrays an dieses Format würde eine Reihe von Vorteilen mit sich bringen: So ermöglicht der Einsatz des in der DNA-Microarray-Technologie gebräuchlichen Formats ein hohes Maß an Parallelisierbarkeit und Multiplexing, welches von den Bead- oder Faser-basierten Microarray-Formaten nicht geleistet werden kann. Außerdem kann das heute weit verbreitete Equipment aus der DNA-Microarray-Technologie verwendet werden, wodurch viele wissenschaftliche Einrichtungen die Microarrays anwenden könnten. Eine Literaturrecherche nach Aptamer-basierten Microarrays, die auf planaren Glas-Substraten etabliert wurden, erbringt eher wenige Treffer (Tabelle 1.3).

So verwendeten Cho et al. (2006) jeweils zwei DNA Aptamere (anti-IgE, anti-Thrombin) und zwei RNA-Aptamere (anti-Lysozym, anti-Ricin) auf einem Microarray. Da die verwendeten Aptamere unter verschiedenen SELEX-Bedingungen in unterschiedlichen Puffern selektiert worden waren, wurde von Cho et al. ein „Kompromiss-Puffer“ entwickelt, in dem die vier verwendeten Aptamere Aktivität aufwiesen. [18]

Stadtherr et al. (2005) verwendeten ein anti-IgE und das anti-Thrombin-Aptamer zur Herstellung eines Aptamer-Microarrays. Mit diesem Microarray gelang die duale Proteindetektion und der Nachweis der Analyten auch in komplexen Proben. Da die beiden verwendeten Aptamere nicht in dem gleichen Puffersystem selektiert worden sind, mussten die beiden Analyten jedoch nacheinander detektiert werden. Es wurde eine vergleichende Studie mit dem IgE-Aptamer und einem anti-IgE Antikörper durchgeführt. Dabei zeigten Aptamer und Antikörper eine ähnliche Sensitivität (Antikörper 50 ng/ml, Aptamer 10 ng/ml) und das Aptamer war dem Antikörper in Bezug auf die Spezifität sogar überlegen. [152]

Einige Firmen beschäftigen sich intensiv mit Aptameren, so z.B. die Firma SomaLogic, die einen Schwerpunkt ihrer Aktivitäten auf den Bereich der Aptamer-basierten Microarrays gelegt hat. So veröffentlichte SomaLogic einen der wenigen weit entwickelten Aptamer-Microarrays, der ca. 50 verschiedene Analyten aus humanen Proben vermessen kann. [129] Als immobilisiertes Fängermolekül verwendet SomaLogic Photoaptamere. [12] Dabei er-



laubt die Verwendung von 5'-Iodo oder 5'-Bromo-substituiertem Uridin (BrdU) Triphosphat ein *Crosslinking* zwischen dem immobilisierten Aptamer und dem Target-Protein durch UV Anregung. [147, 12] Im Falle des BrdU erfolgt das *Crosslinking* durch Anregung bei 308 nm zwischen dem photoaktiviertem BrdU und einer elektronenreichen Aminosäure des Proteins. Das *Crosslinking* zwischen Aptamer und Target verläuft dabei spezifisch. Zwar kann ein Protein auch unspezifisch an das Aptamer binden, die Wahrscheinlichkeit dafür, dass dabei eine geeignete Aminosäure in die Nähe des BrdU kommt ist jedoch gering. [147, 108] Da das *Crosslinking* abhängig von der Orientierung des BrdU und der Aminosäure im Protein ist, ist es auch abhängig von der Spezifität der Aptamer-Protein-Erkennung. Ein Vorteil der Verwendung von Photoaptameren besteht darin, dass der Chip nach dem *Crosslinking* unter harschen Bedingungen gewaschen werden kann, wodurch unspezifisch gebundene Proteine abgewaschen werden. Da sich Fängermolekül (Aptamer) und Target grundsätzlich voneinander unterscheiden, lässt sich das Bindungsereigniss einfach durch gewöhnliche Protein-*Stain*-Methoden detektieren.

Tabelle 1.2.: Übersicht über unterschiedliche publizierte Sensoren bei denen Aptamere eingesetzt werden.

Literatur	Sensortyp/Detektion	Aptamer (DNA/RNA)	LOD	Regenerierbarkeit
Li et al. (2007) [92]	<i>Surface Plasmon Resonance Imaging</i> (SPRI)	anti-Thrombin (DNA) anti-Thrombin (RNA) anti-VEGF (RNA)	1 pM (VEGF)	
Porschewski et al. (2006) [127]	Luminex- <i>Bead</i> basierter Assay	anti-Thrombin (DNA) anti-HIV-Rev (RNA)	1,5 nM (Thrombin)	
Bang et al. (2005) [6]	Elektrochemische Detektion mit <i>Molecular Beacons</i>	anti-Thrombin (DNA)	11 nM	7 M Harnstoff
Schlenzog et al. (2004) [146]	<i>Surface Acoustic Wave</i> (SAW)	anti-Thrombin (DNA) anti-HIV-Rev (RNA)	75 pg/cm <sup>2</sup>	0,1 M NaOH
Baldrich et al. (2004) [5]	<i>Enzyme Linked Aptamer Assay</i> (ELAA)	anti-Thrombin (DNA)	1 nM	
Kirby et al. (2004) [80]	<i>Electronic Tongue</i> (ET)	anti-Lysozym (DNA) anti-Lysozym (RNA) anti-HIV Rev (DNA) anti-Ricin (RNA)	320 ng/ml (Ricin)	100 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA 7 M Harnstoff pH 5,0
Savran et al. (2004) [144]	Mikromechanischer Cantilever Sensor	anti-Taq Polymerase (DNA)	50 pM	Königswasser (3:1 HCl/HNO <sub>3</sub> )
Liss et al. (2002) [94]	Quarzkristall Biosensor	anti-IgE (DNA)	0,5 nM	50 mM EDTA
Lee et al. (2000) [91]	Faser Optischer Sensor	anti-Thrombin (DNA)	1 nM	6 M Guanidin Hydrochlorid
Potyrailo et al. (1998) [128]	<i>Evanescent Wave Induced Fluorescence Anisotropy</i>	anti-Thrombin (DNA)	0,7 amol/140 pl	Guanidin Hydrochlorid

Tabelle 1.3.: Übersicht über publizierte Aptamer-Microarrays.

Literatur	Microarray-Oberfläche / Aptamer-Modifikation	Aptamer (DNA/RNA)	LOD	Anmerkungen
Cho et al. (2006) [18]	Streptavidin/Biotin	anti-Lysozym (RNA) anti-Ricin (RNA) anti IgE (DNA) anti-Ricin (DNA)	5 pM Lysozym 0,5 pM Ricin 0,01 nM IgE 5 nM Thrombin	
Collett et al. (2005) [21]	Streptavidin/Biotin	anti-Lysozym (RNA)	70 fM	
Yamamoto Fujita et al. (2005) [170]	Aldehyd/NH <sub>2</sub>	anti HIV-1 Tat (RNA)		ADONMA ( <i>Analyte Dependent Oligonucleotide Modulation Assay</i> )
Stadtherr et al. (2005) [152]	Aldehyd/NH <sub>2</sub>	anti-Thrombin (DNA) anti-IgE (DNA)	10 ng/ml IgE	Duale Proteindetektion möglich.
Bock et al. (2004) [12]	NHS/NH <sub>2</sub>	anti-Interleukin anti-VEGF anti-Endostatin	10 fM	Anwendung von Photoaptameren.

## *1. Aptamere und ihre Anwendungen*

## 2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung Aptamer-basierter Protein-Microarrays. Im Folgenden werden die zur Entwicklung Aptamer-basierter Microarrays verwendeten Methoden geschildert. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3 ab Seite 109 dargestellt.

### 2.1. Bereitstellung der verwendeten Proteine

Der *E. coli* Stamm *E. coli* JM109 pET-bgl-his zur Produktion von Bgl-His wurde freundlicherweise von PD Dr. Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die Plasmide zur Expression verschiedener His-getaggtter Esterasen (*Pseudomonas fluorescens* Esterase I, *Bacillus subtilis* Esterase, *Bacillus subtilis* p-Nitrobenzylesterase und *Bacillus stearothermophilus* Esterase) wurden von Prof. Uwe Bornscheuer (Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.1. Transformation und Expression

##### Transformation

Transformationen wurden unter Verwendung des *E. coli* Sicherheitsstammes K12 nach der TSS-Methode durchgeführt.

1. Kultivierung des *E. coli* Sicherheitsstammes K12:

- Es wurde eine Kultur des *E. coli* Sicherheitsstammes K12 in 100 ml LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, ohne Antibiotikazugabe) gezogen.
- Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 durch 10 minütige Zentrifugation bei 1000 g geerntet.

2. Herstellung kompetenter Zellen:

- Das Pellet wurde auf Eis gekühlt und in 10 ml eiskaltem TSS (LB-Medium, 10% PEG, 5% DMSO, 30 mM Magnesiumchlorid) resuspendiert.
- Es wurden Aliquots von 200 µl erstellt. Diese wurden direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

3. Transformation:

## 2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays

- Zu einem Aliquot (200  $\mu$ l) der kompetenten Zellen wurde die entsprechende Menge des jeweiligen Plasmids (20 ng) zugegeben.
- Der Ansatz wurde für 1 h auf Eis inkubiert.
- Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gelagert.
- Es wurden 800  $\mu$ l LB-Medium zugegeben.
- Die Kultur wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.
- Die Zellen wurden herunterzentrifugiert (1 min 10000 rpm) und 500  $\mu$ l des Überstandes entfernt. Im restlichen Überstand wurde das Pellet resuspendiert.

## 4. Selektion der transformierten Zellen:

- Zur Selektion der transformierten Zellen wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.
- Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- Eine einzelne Kolonie wurde zum Animpfen einer Vorkultur verwendet. Für die Kultivierung wurde LB-Medium mit Antibiotikazugabe (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) verwendet.

## 5. Anlegen von Gefrierkulturen:

- Es wurde eine Hauptkultur angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 zum Anlegen von Gefrierkulturen verwendet.
- Dazu wurden 800  $\mu$ l der Hauptkultur mit 200  $\mu$ l Glycerin gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert, bevor die Gefrierkulturen bei -80°C eingefroren wurden.

## Expression

- Alle Kultivierungen wurden in LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) durchgeführt. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Systec V-150, Systec GmbH, Wettenberg) für 20 min bei 121°C und 1.013\*10<sup>5</sup> Pa autoklaviert.
- Nach Abkühlen des Mediums wurde sterilfiltriertes Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugegeben.
- Übernacht-Vorkulturen wurden mit Gefrierkulturen angeimpft, die Hauptkulturen mit 0,5 ml der Vorkultur auf 100 ml LB-Medium.
- Alle Kultivierungen wurden bei 120 rpm und 30°C durchgeführt. Zur Verfolgung des Wachstums wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) gemessen.
- Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Expression von Bgl-His mit IPTG induziert (Konzentration im Medium: 1 mM). Die Induktion der Expression erfolgte für die Esterasen mit 0,2% Rhamnose.
- Nach Beendigung der Kultivierungen wurden die Bakterien von ihren Flüssigmedien durch Zentrifugation (30 min bei 4°C und 3345 g) abgetrennt.

- Die Überstände wurden sterilfiltriert.
- Die Pellets wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Ultraschall (60 W, 6 min, 0,3 s Pulsdauer) unter Eiskühlung aufgeschlossen.
- Nach 30 min Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 14000 g wurden die erhaltenen Lysate ebenfalls sterilfiltriert.

### 2.1.2. Proteinaufreinigung

#### Prinzip

Bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*; IMAC) wird die Affinität von Metallionen gegenüber bestimmten Aminosäuren ausgenutzt. Dabei werden Metallionen mit Hilfe von kovalent an einen Träger gebundenen mehrzähligen Liganden fest in ein Chelat eingebunden. Bestimmte funktionelle Gruppen an der Oberfläche von Peptiden, Proteinen und Polynukleotiden können mit den freien Koordinationsstellen des Metalls in Wechselwirkung treten. Der Bindung des Proteins an das Metallion liegt die Wechselwirkung zwischen Elektronendonoren an der Proteinoberfläche und dem Elektronenakzeptor Metallion zu Grunde. Die primär verwendeten Chelatbildner sind Iminodiessigsäure (*Iminodiacetic Acid*, IDA) und Nitrilotriessigsäure (*Nitrilotriacetic Acid*, NTA). Die Selektivität der Metallchelate-Affinitätschromatographie ist durch Kombination der Chelatbildner mit unterschiedlichen Metallionen steuerbar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden als Chromatographiemedien mit IDA funktionalisierte Membranadsorber aus regenerierter Zellulose (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) verwendet.

#### 2.1.2.1. Proteinaufreinigung: Screening

Bei der Aufreinigung über IDA-Membranen können verschiedene Metallionen auf ihre Eignung zur Reinigung des zu analysierenden His-Tag-Proteins untersucht werden. Dazu wurden im Rahmen dieser Dissertation Vivawell-8-Strips (Sartorius Stedim Biotech GmbH) verwendet (Abb. 2.1). Das folgende Protokoll beschreibt das *Screening* nach dem optimalen Metallion unter Verwendung dieser modularen Membranadsorbereinheiten. Es wurden jeweils 300 µl Flüssigkeit pro Well aufgegeben. Die Zentrifugationen wurden jeweils bei 1280 g durchgeführt. Vor der Aufreinigung wurden die Kulturüberstände unter Verwendung einer Crossflow Einheit (Vivaflo, Sartorius Stedim Biotech GmbH) mit geeignetem MWCO aufkonzentriert. Alle verwendeten Puffer sowie die Kulturüberstände und die Lysate wurden vor der Aufreinigung sterilfiltriert.

Verwendete Puffer:

- Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
- Waschpuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
- Elutionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Durchführung:

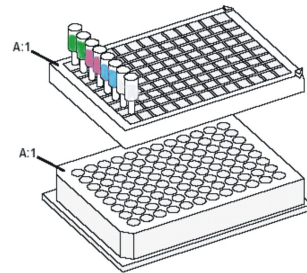


Abbildung 2.1.: Anordnung der 8-Strips auf Mikrotiterplatten sowie Beladung der Membranen mit unterschiedlichen Metallionen.

- Die Wells der 8-Strips wurden mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet und für 1 min zentrifugiert.
- Es wurden je 300 µl der zu untersuchenden Metall-Salz-Lösungen auf die Membranen gegeben, die Zentrifugation erfolgte für 1 min. Dabei wurden folgende Metallsalz-Lösungen verwendet: 0,5 M NiSO<sub>4</sub>, 0,5 M CoCl<sub>2</sub>, 0,5 M CuSO<sub>4</sub> und 0,5 M ZnSO<sub>4</sub>. Dieser Schritt wurde wiederholt.
- Anschließend wurden die Membranen zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und 1 min zentrifugiert.
- Die Wells wurden zweimal mit Bindungspuffer equilibriert, Zentrifugation für 1 min.
- Die proteinhaltige Probe wurde auf die Membranen gegeben und 3 min zentrifugiert. Das Beladen kann bei Verwendung niedrig konzentrierter Protein-Lösungen mehrfach wiederholt werden, bis die Bindungskapazität der Membran erschöpft ist.
- Bei den drei nachfolgenden Waschschrritten mit dem Waschpuffer wurde jeweils 3 min zentrifugiert.
- Das Protein wurde mit dem Elutionspuffer in drei Schritten eluiert (Zentrifugationen jeweils 3 min).

Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und mit dem Bioanalyser (Agilent) analysiert.

#### 2.1.2.2. **Proteinaufreinigung mittels FPLC**

Nach Bestimmung des zur Aufreinigung am besten geeigneten Metallions wurde die Proteinaufreinigung unter Verwendung dieses Metalls im größeren Maßstab an der FPLC (Bio-Logic AVR7-3, BIO-RAD) durchgeführt. Als Chromatographiemedium wurden dabei ebenfalls Membranadsorbereinheiten (Sartobind IDA 75, Sartorius, Hannover) eingesetzt. Der Chromatographie-Prozess wurde durch Messung mit dem Durchflussdetektor bei 280 nm verfolgt. Für die Aufreinigung wurde eine Flußrate von 1 ml/min verwendet. Alle verwendeten Puffer sowie die Kulturüberstände und die Lysate wurden vor der Aufreinigung sterilfiltriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 510 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) entgast.

Für die Aufreinigung von Bgl-His wurden folgende Puffer verwendet:



- Equilibrierungspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5
- Metallsalzlösungen: 0,1 M Metallsalz, 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5
- Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8
- Elutionspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, 0,1 M Imidazol, pH 4,5

Die Aufreinigung der Esterasen erfolgte mit den unter 2.1.2.1 angegebenen Puffern.

Durchführung:

- Die Sartobind IDA 75 Einheit wurde mit 10 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.
- Die Einheit wurde mit 10 ml der Metallionenlösung beladen.
- Um nicht gebundenes Metall zu entfernen, wurde mit 20 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.
- Die Einheit wurde mit 20 ml Bindungspuffer gespült.
- Die Probe (aufkonzentrierter Überstand oder Lysat) wurde in dem Bindungspuffer verdünnt und über die Membranadsorbereinheit geleitet.
- Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer.
- Zur Regeneration der Membran wurde mit 10 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und die Metallionen wurden mit 10 ml 1 M Schwefelsäure entfernt.
- Die Membran wurde mit 20 ml Equilibrierungspuffer gewaschen.

### 2.1.3. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

#### Prinzip

Die reaktiven Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 werden unter anderem zum Proteinlabeling verwendet. Beide sind wasserlöslich, Cy3 besitzt ein Anregungsmaximum bei 550 nm und emittiert maximal bei 570 nm. Cy5 erfährt seine höchste Anregung bei 649 nm und emittiert maximal bei 670 nm. Die Fluorophore Cy3 und Cy5 werden beim Labeling als N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester eingesetzt. Die NHS-Ester werden durch Reaktion mit aliphatischen Aminogruppen unter Iminbildung an die Proteine gebunden.

#### 2.1.3.1. Durchführung nach Herstellerangaben

Im folgenden ist das vom Hersteller der Cy3 Mono-Reaktive Dyes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) empfohlene Protokoll dargestellt. Es wurde entwickelt, um IgG-Antikörper zu markieren.

- Es wird eine 1 mg/ml Lösung des zu markierenden Proteins in 0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,4 erstellt.
- 1 ml dieser Lösung wird zu einem Vial des Farbstoffes gegeben, es wird gründlich gemischt.

## 2. *Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays*

- Die Lösung wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 10 min gemischt.
- Der überschüssige Farbstoff wird durch Gelfiltration oder Dialyse abgetrennt.

Zur Abtrennung überschüssigen Farbstoffes wurde bei allen Versuchen zunächst intensiv umgepuffert (Microcon-3, Millipore GmbH, Schwalbach) sowie zweimal mit Desalting Spin Columns (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) entsalzen.

### **2.1.3.2. Protokolloptimierung**

Das oben dargestellte Protokoll nach Herstellerangaben wurde zum Labeling von IgG entwickelt. Versuche, andere Proteine nach diesem Protokoll mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, verliefen nicht befriedigend. So wurde beim Labeling von Bgl-His mit Cy3 lediglich eine D/P von ca. 0,25 erreicht. Um das Labeling von Bgl-His zu optimieren, wurden Versuche durchgeführt, bei denen das Verhältnis von Protein zu Dye, der pH-Wert während des Labelings sowie die Reaktionsdauer variiert wurden.

#### **2.1.3.2.1. Variation des Verhältnisses zwischen Protein und Dye**

Hierbei wurde die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes im Vergleich zu den unter 2.1.3.1 dargelegten Herstellerangaben variiert. Die Proteinlösungen A, B, C und D weisen die halbe, die gleiche, die doppelte und die fünffache Fluoreszenzfarbstoffmenge der vom Hersteller empfohlenen Menge auf.

#### **2.1.3.2.2. Variation des pH Wertes**

Abweichend Hersteller-Protokoll wurde der Farbstoff im PBS-Puffern mit den pH-Werten 7, 8 und 9,5 gelöst. Zusätzlich wurde ein Versuch in einem kommerziell erhältlichen Labeling-Puffer (BD Biosciences Extraction&Labeling Buffer pH 8,9) durchgeführt.

#### **2.1.3.2.3. Variation der Reaktionszeit**

Hier wurde die im Vergleich zur Herstellerangabe dreifache Farbstoffmenge (Abschnitt 2.1.3.2.1, Verhältnis D) eingesetzt. Abweichend vom unter ursprünglichen Protokoll wurden nach jeweils 1 h; 3,75 h; 6,75 h und 23 h Proben entnommen.

### **2.1.3.3. Bestimmung der Markierungseffizienz**

#### **2.1.3.3.1. Messung der D/P Ratio**

Die Messung der D/P Ratio erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc; Wilmington, DE, USA) im Modus "Proteins & Labels" unter Einstellung des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffes. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde dabei angenommen, dass 1 mg/ml des Proteins zu einer  $A_{280}$  von 1 führt.

#### 2.1.3.3.2. Test der markierten Proteine auf einem Protein-Microarray

Um zu überprüfen, ob das durchgeführte Labeling zu einer ausreichenden Signalqualität- und Intensität im Microarray-Experiment führt, wurden Versuche auf membranbasierten Microarrays durchgeführt. Dabei konnte außerdem ermittelt werden, ob das Labeling mit der molekularen Erkennung des His-Tags durch den Antikörper interferiert. Da sowohl der Antikörper als auch die verwendeten Aptamere gegen den His-Tag das selbe Target besitzen, sollten Proteine, die durch den Antikörper erkannt werden, ebenfalls durch das Aptamer gebunden werden können.

- Auf einem auf der schwarzen Nitrocellulosemembran 13004 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) basierten Protein Microarray wurde ein gegen den His-Tag gerichteter Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS + 0,5% Trehalose mit 5 hits/dot in 10 Replikaten gespottet. Zum Spotten wurde der GMS 417 Arrayer Version 1.5.0 verwendet.
- Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran für 30 min mit 1% BSA in PBS geblockt.
- Danach wurde einmal für 5 min mit PBS-Puffer und zweimal für jeweils 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Nachdem Wasserreste vom Glas entfernt wurden, wurde eine Hybridisierungskammer (Secure Seal Hybridisation Chamber, Grace Biolabs) auf den Slide geklebt und mit 600 µL Hybridisierungspuffer bestehend aus PBS + 0,2% TopBlock, in dem das zu untersuchende gelabelte Protein in einer Konzentration von 2 µg/ml verdünnt wurde, befüllt. Die Öffnungen wurden mittels Adhesive Seal-Tabs (Invitrogen, Karlsruhe) verschlossen.
- Der Slide wurde daraufhin in einem Thermomixer comfort mit Slide Aufsatz (Eppendorf, Hamburg) für 16 h bei 25°C und 300 rpm inkubiert.
- Der Slide wurde freigelegt und dreimal für jeweils 5 min mit 2\*SSC + 0,1% SDS, 1\*SSC und 0,5\*SSC gewaschen.
- Das Trocknen des Slides wurde bei 29°C im Hybridisierungs-Ofen (Thermo Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) für 15 min durchgeführt.
- Die Slides wurden mit dem GenePix<sup>®</sup>4000B Scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) bei einer Laser Power von 33% unter Verwendung unterschiedlicher PMT-Einstellungen gescannt. Die Auswertung erfolgte mit ImaGene<sup>TM</sup> 5.5.3 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA).

Die Bewertung der Labeling-Güte erfolgte auf Basis der erhaltenen Signalintensitäten und der SNR in Abhängigkeit von der D/P.

#### 2.1.3.3.4. Optimiertes Protokoll

Im Folgenden wird das für das Labeling von Bgl-His optimierte Protokoll dargestellt:

- Die Proteinlösung wird mit 0,1 M Natriumcarbonatpuffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht.
- Es werden 0,2 ml des in 0,1 M Natriumcarbonatpuffers gelösten Proteins zu dem Fluoreszenzfarbstoff (1 Vial Cy3 mono-Reactive Dye) gegeben und gut vermischt.
- Die anschließende Inkubation findet bei RT für 1 h unter Lichtausschluss mit zusätzlicher Durchmischung alle 15 min statt.
- Vor der anschließenden Anwendung auf Microarrays wird unter Verwendung von Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (3 kDa MWCO, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) zweimal intensiv in PBS umgepuffert, aufkonzentriert und 2 mal mit Protein Desalting Spin Columns (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) entsalzen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

## 2.2. Charakterisierung der Aptamere

### 2.2.1. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

#### Messprinzip

Mit der Isothermalen Titrationskalorimetrie wird die Energetik von molekularen Wechselwirkungen über Wärmeeffekte bei konstanter Temperatur vermessen. Dabei wird eine Bindungsisotherme bestimmt, die den Grad der Sättigung eines Proteins in Abhängigkeit von der Konzentration des zu bindenden Moleküls wiedergibt. Zu diesem Zweck werden kleine Mengen des Liganden mit Hilfe einer computergesteuerten Spritze zu einer Lösung des Proteins, das in der Messzelle vorgelegt wird, titriert. Nach jeder Injektion wird die vom System aufgenommene (endotherme Reaktion) bzw. abgegebene Wärme (exotherme Reaktion) im Vergleich zu einer nur mit Puffer gefüllten Referenzzelle gemessen. Die Wärmeänderung wird mit Hilfe der elektrische Energie überwacht, die benötigt wird, um die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen möglichst klein zu halten.

#### Experimenteller Ablauf

Die Messungen wurden mit dem isothermalen Titrationskalorimeter VP-ITC von MicroCal (Northampton, USA) durchgeführt. Das Volumen der Messzelle beträgt 1,41 ml. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt, die Temperatur wurde mithilfe des Thermostat des Kalorimeters konstant gehalten. Damit die gemessenen Reaktionswärmen nicht von Verdünnungseffekten des Puffers überlagert werden, ist entscheidend, sowohl das Protein als auch das Aptamer in den gleichen Puffer-Lösungen zu lösen. Dafür wurde der Selektionspuffer des Aptamers (PBST-6H7) verwendet. Das Aptamer wurde vor der Messung für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt, um eine korrekte Faltung zu erzielen. Bei einer 1:1 Bindung müssen die Konzentrationen so gewählt werden, dass die Gesamtkonzentration des Liganden in der Messzelle am Ende der Messung zweimal so groß ist wie die Gesamtkonzentration an Protein. Damit sollten die letzten Signale,

die beträchtlich hinter dem Äquivalenzpunkt liegen, nur noch aufgrund von Verdünnungswärme des Liganden oder unspezifischen Bindungsvorgängen zustande kommen, da das Protein zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig mit dem Liganden gesättigt ist. Diese Verdünnungswärme muss daher von der eigentlichen Bindungsisothermen subtrahiert werden. Die Anpassung der Bindungsisothermen an die Messpunkte erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*Least Squares Fit*).

- Vor der Messung wurden die Protein-Lösungen über Nacht gründlich gegen PBST-6H7 dialysiert.
- Die Aptamer-Lösungen wurden in PBST-6H7 erstellt, vor der Messung wurde das Aptamer durch 5 min Erhitzen denaturiert und anschließend schnell auf 4°C abgekühlt.
- In der Messzelle wurde die Proteinlösung vorgelegt.
- Das Aptamer wurde in Aliquots von 10 µl in die Messzelle injiziert.

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Origin 5.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA). Die Bindungsparameter wurden durch nichtlineare Kurvenregression der Bindungsisothermen berechnet. Die Bindungskonstante wurde nach Faergeman et al. (1996) aus der Steigung der Isothermen am Equivalenzpunkt bestimmt. [36] Somit wurden folgende Parameter bestimmt:

- Bindungsstöchiometrie ( $n$ )
- Bindungskonstante ( $K_b$  [ $M^{-1}$ ])
- Bindungsenthalpie ( $\Delta H$  [kcal/mol gebundener Ligand])

### 2.2.2. Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

#### Messprinzip

Bei SPR-Messungen besteht der Sensorchip aus einem Glasträger mit aufgedampftem Goldfilm. Licht wird an der Chipoberfläche reflektiert, dabei gerät das Elektronengas der Goldschicht in Schwingung und es wird Energie zur Anregung der elektromagnetischen Oberflächenwellen (Plasmonen) absorbiert. Im reflektierten Licht ergibt sich daraus ein Intensitätsminimum bei der Wellenlänge, deren Energie der Resonanzenergie der Plasmonen entspricht. Verbunden mit der Plasmonanregung ist die Ausbildung eines evaneszenten elektrischen Feldes senkrecht zur Chipoberfläche. Bei Anlagerung von Molekülen (z.B. Analyten) an die Chipoberfläche kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld. Dadurch verändert sich auch Resonanzenergie der Plasmonen mit der Folge, dass es zu einer Verschiebung des Intensitätsminimums des reflektierten Lichts kommt. Das Ausmaß dieser Verschiebung ist proportional zur Masse der gebundenen Moleküle. Die Messung des zeitlichen Verlaufs der Reflektionsänderung während eines Bindungsexperiments ermöglicht die Bestimmung von kinetischen Informationen. Bei diesem Prozess ist eine Markierung des Analyten z.B. mit Fluorophoren nicht notwendig.

## **Experimenteller Ablauf**

Die SPR Messungen wurden am Institut für Pflanzengenetik, Abteilung 2, Pflanzenbiotechnologie der Universität Hannover mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Reinard unter Verwendung der Autolab Esprit (EcoChemie, Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Im Gegensatz zu den Geräten der Biacore-Baureihe wird bei diesem Gerät nicht im Durchfluss gemessen, die jeweilige Probe wird in die Messzelle injiziert und mit Hilfe von Pumpen während der Messung auf der Oberfläche umgewälzt.

Dazu wurden während der Messungen die folgenden Pump- und Mix-Parameter verwendet:

- Pump (1+2) Flow: 16,7  $\mu\text{l/s}$
- Synchronized Mix Flow: 16,7  $\mu\text{l/s}$
- Pump (1+2) Mix Volume: 15  $\mu\text{l}$
- Synchronized Mix Volume: 15  $\mu\text{l}$
- Drain Speed: 250
- Wash Speed: 250

Experimenteller Ablauf:

### 1. Aktivierung der Goldoberfläche:

- Die Sensordisk wurde über Nacht in einer Lösung aus 11 mg 11-Mercaptoundecanonic Acid in 50 ml 98% Ethanol inkubiert
- Der Chip wurde jeweils dreimal mit ddH<sub>2</sub>O und EtOH gründlich gewaschen und mit Druckluft getrocknet.
- Der Chip wurde in den Hemizylinder der Esprit eingesetzt.
- Vor der Immobilisierung der Liganden wurde die Sensordisk durch Waschen mit 10 mM Natriumacetat, pH 4,5 stabilisiert.

### 2. Kopplung des Liganden an die Sensoroberfläche:

- Die Aptamere (6H7 bzw. 6H5) wurden in einer Konzentration von 2,4 mg/ml in 10 mM Natriumacetat pH 4,5 vorgelegt. Für die Immobilisierung des Antikörpers wurde eine Konzentration von 1 mg/ml in 10 mM Natriumacetat pH 4,5 verwendet.
- Nach Angaben des Geräteherstellers wurden die folgenden Lösungen in die Wells einer Mikrotiterplatte verteilt: 75  $\mu\text{l}$  0,4 M EDC, 75  $\mu\text{l}$  0,1 M NHS, 75  $\mu\text{l}$  des Liganden in Natriumacetat (siehe oben), 75  $\mu\text{l}$  1 M Etanolamin pH 8,5. Außerdem wurde 10 mM Natriumacetat pH 4,5 als Kopplungspuffer sowie 0,1 M HCl als Regenerationspuffer bereitgestellt.
- Die Kopplung wurde im "Ligand Immobilization Mode" des Gerätes vollautomatisch durchgeführt. Dabei wurde die Sensoroberfläche zunächst für 120 s mit dem Kopplungspuffer gespült, bevor für 300 s die Aktivierung mit dem Gemisch aus NHS und EDC durchgeführt wurde. Anschließend wurde der Ligand für 1800 s auf die Sensoroberfläche gegeben. Es folgte die Deaktivierung verbleibender reaktiver Gruppen mit Ethanolamin (600 s) sowie die Regeneration der Oberfläche mit 0,1 M HCl.

3. Messung der Bindung von PFEI an die immobilisierten Liganden:

- Vor den Bindungsstudien wurde die Oberfläche mit dem Bindungspuffer PBST-6H7 gespült, bis im Senseogramm keine Änderungen mehr zu erkennen waren.
- Die Bindungsexperimente wurden im “Full Kinetic Kurve Plot” Modus des Gerätes aufgenommen. Es wurden verschiedene Konzentrationen an PFEI (15,6 µg/ml - 5 mg/ml, in steigender Konzentration) in PBST-6H7 in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Zwischen den einzelnen Messungen wurde das PFEI vom immobilisierten Liganden eluiert. Dazu wurde im Falle immobilisierter Aptamere 1% SDS verwendet. Der immobilisierte Antikörper wurde mit 0,1 M HCl regeneriert.
- Alle Messungen wurden gegen eine Referenzmesszelle durchgeführt. Auch in dieser Zelle lag immobilisierter Ligand vor, es wurde jedoch während der Aufnahme der Bindung lediglich PBST-6H7 und kein PFEI zugegeben. Alle anderen Schritte wurden in beiden Messzellen identisch durchgeführt, um Signale, die durch einen Pufferwechsel entstehen, zu eliminieren.
- Die Messungen wurden von der Esprit vollautomatisch aufgenommen. Dazu wurde zunächst für 120 s mit PBST-6H7 gespült, bevor das Targetprotein für 1800 s auf die Oberfläche gebracht wurde. Die Dissoziation wurde für 300 s durchgeführt, abschließend wurde für 300 s regeneriert.

### Auswertung

Zunächst wurde das relative SPR-Signal durch Subtraktion des Signals der Referenzzelle von dem Signal der Messzelle gebildet. Zur Berechnung der Bindungsisothermen wurden mit Hilfe von MicroCal Origin 6.0 das maximal erreichbare SPR Signal ( $R_{eq}$ ) für jede einzelne Messung berechnet. Dazu wurde die nichtlineare Kurvenregression nach Boltzmann verwendet. Die so erhaltenen  $R_{eq}$ -Werte wurden gegen die Konzentration an PFEI aufgetragen.

## 2.3. Immobilisierung von Aptameren auf unterschiedlichen Oberflächen

### 2.3.1. Nachweis der Immobilisierung mit Sybr Green II

Der Nachweis von einzelsträngigen Oligonukleotiden kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green II erfolgen. Dieser Farbstoff weist eine hohe Affinität gegenüber ssDNA auf und kann somit zur Qualitätskontrolle verwendet werden. So kann die Anwesenheit, die Spotmorphologie und die relative Signalintensität als Maß der Dichte der immobilisierten Aptamere vor dem eigentlichen Experiment bestimmt werden. Die Sybr Green II gefärbten Microarrays können vollständig entfärbt werden und in weiteren Experimenten genutzt werden. [8]

Durchführung:

## 2. Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays

- Der Slide wurde für 1 min in kochendem ddH<sub>2</sub>O inkubiert, um eventuell im Aptamer vorhandene Basenpaare aufzubrechen.
- Anschließend wurde der Slide sofort mit Druckluft getrocknet, um ein Rückfalten des Aptamers zu verhindern.
- Der Slide wurde für 5 min in einer 1:10000 Lösung aus Sybr Green II in TAE inkubiert. Dabei und bei den folgenden Waschschrritten wurde er vor Licht geschützt.
- Der Slide wurde für 1 min mit TAE gewaschen.
- Der Slide wurde für 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Vor dem Scannen wurde der Slide mit Druckluft getrocknet.

### 2.3.2. Aptamere auf Aldehydslides

Aldehyd-modifizierte Oberflächen werden routinemäßig zur Herstellung von DNA-Chips verwendet. In dem folgenden Protokoll wurde das Spotten der Aptamere und das Reduzieren der Slides direkt aus einem Standardprotokoll (internes Protokoll des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover) für DNA-Chips übernommen. Die weiteren Schritte des Protokolls wurden an die besonderen Anforderungen eines Aptamers angepasst. So wurde ein Denaturierungs-Schritt eingefügt, der das Aptamer linearisiert, bevor durch Inkubation in dem Puffer, in dem das Aptamer selektiert wurde, die Faltung des Aptamers in die zur Erkennung des Targets notwendige dreidimensionale Struktur erfolgt.

- Die Oligonukleotide wurden in Konzentrationen von 100 µM in 3\*SSC mit dem Arrayer mit 5 hits/dot auf Aldehyd-modifizierte Slides (VSS-25 Silylated Slides, CEL Associates, Inc., Pearland, Texas, USA) gespottet und die bedruckten Slides über Nacht dunkel gelagert.
- Die Slides wurden für 2 min mit 0,2% SDS gewaschen.
- Die Slides wurden zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die verbleibenden Aldehyd-Funktionen wurden reduziert, indem für 5 min mit einer Lösung aus 0,5 g NaBH<sub>4</sub> in 150 ml PBS und 50 ml EtOH inkubiert wurde.
- Anschließend wurde für 1 min mit eiskaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Es folgte ein einminütiger Waschschrtritt mit 0,2% SDS.
- Es wurde zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die Slides wurden für 30 min mit 1% BSA in dem Selektionspuffer des jeweiligen Aptamers geblockt.
- Die Slides wurden mit dem Selektionspuffer gewaschen.
- Die Aptamere wurden denaturiert, indem der Slide für 1 min in kochendes ddH<sub>2</sub>O gelegt wurde.
- Zur Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur des Aptamers wurde der Slide für 30 min in dem Puffer inkubiert, in dem das Aptamer selektiert wurde.



- Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Targetprotein bei 20°C und 300 rpm im Thermoschüttler mit Slideaufsatz (Eppendorf). Standardinkubationszeit war 1 h.
- Der Slide wurde zweimal für je 5 min mit dem Selektionspuffer gewaschen. Dabei wurde er vor Lichteinstrahlung geschützt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.
- Vor dem Scannen wurde der Slide mit Druckluft getrocknet.

## 2.4. Gerichtete Immobilisierung von Aptameren

Um Aptamere unter Erhalt ihrer Aktivität zu immobilisieren, müssen sie in gerichteter Form auf der Microarray-Oberfläche vorliegen. Dazu wurde ein Protokoll entwickelt, in dem die Aptamere mit Cyanurchlorid aktiviert werden. Diese aktivierten Aptamere können an eher unreaktive Amino-modifizierte Oberflächen gebunden werden. Darüber hinaus wurden Versuche mit einem zusätzlichen Spacer durchgeführt, der sterische Hinderungen des Aptamers minimieren soll.

### 2.4.1. Aktivierung von Aptameren mit Cyanurchlorid

Die Verwendung von Cyanurchlorid zur Aktivierung primären Aminogruppen wird schon seit langem zur Immobilisierung von Proteinen [47, 148] oder Oligonukleotiden verwendet. [46] Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-Triazin) enthält 3 acyl-analoge Chloratome und ist dadurch zur Reaktion mit primären Aminogruppen fähig. [47] Nach Van Ness et al. (1991) verläuft die Aktivierung von Oligonukleotiden mit Cyanurchlorid dabei ausschließlich über den terminalen Amino-Linker und nicht innerhalb der Nukleobasen des Oligonukleotids. [161] Das von Ferguson et al. (1996) verwendete Protokoll zur Aktivierung von Oligonukleotiden wurde zunächst auf die Aptamere übertragen. [46]

Durchführung nach Ferguson et al. (1996):

- Zu einer Lösung von 50 nmol Amino-modifizierten Aptamer in 450 µl 0,1 M Natriumborat (SBB) wurde eine Lösung von 25 nmol Cyanurchlorid in 50 µl Acetonitril gegeben.
- Die Aktivierung wurde bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt.
- Nicht reagiertes Cyanurchlorid wurde durch Umpuffern mit Microcon-3 Einheiten (3 kDa MWCO, Millipore GmbH, Schwalbach) entfernt.
- Nach Ferguson et al. (1996) ist das aktivierte Oligonukleotid bei 4°C für einen Monat stabil.

#### 2.4.1.1. Optimierung der Aktivierung mit Cyanurchlorid

Ausgehend von dem Protokoll nach Ferguson et al. (1996) wurde das Protokoll zur Aktivierung der Aptamere mit Cyanurchlorid optimiert. Dazu wurde das 5' Amino-modifizierte

6H7-Aptamer verwendet und es wurde das molare Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid variiert (1:0,5, 1:1, 1:5, 1:100). Darüber hinaus wurden Versuche zur Aktivierung der Aptamere in dem Selektionspuffer PBS-6H7 durchgeführt. Der Aktivierungserfolg wurde nach Immobilisierung des Aptamers mittels Sybr Green II Färbung beurteilt. Darüber hinaus wurden Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem Bgl-His durchgeführt, um die Aktivität des Aptamers zu bestimmen.

#### **2.4.1.2. Optimierte Protokoll zur Aktivierung**

Im Folgenden ist das optimierte Protokoll zur Aktivierung von 6H7 dargestellt:

- Es wird eine Lösung von 50 nmol 6H7 in 450  $\mu$ L PBS-6H7 mit einer Lösung von 250 nmol Cyanurchlorid in 50  $\mu$ l Acetonitril versetzt.
- Die Reaktion wird für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt.
- Es folgt ein intensives Umpuffern in PBS-6H7 mit Microcon-3 Einheiten (3 kDa MW-CO, Millipore GmbH, Schwalbach) um nicht reagiertes Cyanurchlorid zu entfernen.
- Zur Immobilisierung wird das aktivierte Aptamer in PBS-6H7 verdünnt.

#### **2.4.1.3. Beschichtung von Aldehyd-Slides mit PEI**

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Microarray-Substrat VSS-25 Silylated Slides (CEL Associates, Inc., Pearland, Texas, USA) wurden PEI-beschichtete Substrate hergestellt. Dazu wurden die Slides für 1 h bei Raumtemperatur in einer 5%-igen PEI Lösung geschüttelt. Anschließend wurden die Slides 2-mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Vor dem Spotten wurden die PEI-modifizierten Slides über Nacht trocken und dunkel gelagert.

#### **2.4.1.4. Immobilisierung der aktivierten Aptamere**

Die aktivierten Aptamere wurden mit dem Affymetrix 417<sup>TM</sup> Arrayer auf die mit Amino-Funktionen beschichteten UltraGAPS<sup>TM</sup> Coated Slides (Corning, Acton, MA, USA) oder auf selbst hergestellte PEI-modifizierte Microarray-Substrate gespottet. Dabei wurde mit 5 hits/dot gespottet, wobei nach Angaben des Herstellers des Arrayers insgesamt 500 pl je spot appliziert wurden. Als Spotting-Puffer wurde der selbe Puffer verwendet, in dem die Aktivierung durchgeführt wurde (für 6H7 und 6H5: SBB oder PBS-6H7, miniStrep und anti-Daunomycin: SBB). Vor Durchführung von Bindungsstudien wurden die Slides über Nacht trocken und dunkel gelagert.

#### **2.4.1.5. Umpolung der Oberfläche**

Die mit aktivierten Aptameren bedruckten GAPS- und PEI-Microarrays wurden in einer frisch angesetzten Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 ml DMSO und 1 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,4 für 5 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Slides kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und 2-mal für 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Slides wurden direkt im Anschluss weiterverwendet.

## 2.5. Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem Target-Protein

Die Microarrays mit immobilisiertem Aptamer wurden wie oben beschrieben umgepolt. Anschließend wurde die Oberfläche für 30 min in 1% BSA in PBS-6H7 blockiert. Es wurde für 5 min mit PBS-6H7 gewaschen, bevor die Slides mit kochendem ddH<sub>2</sub>O übergossen und für 1 min inkubiert wurden. Die korrekte Faltung des Aptamers wurde durch 30 min Inkubieren in PBST-6H7 erreicht. Die Bindung des Target-Proteins wurde mit 800 µL Protein-Lösung in PBST-6H7 bei 20°C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 1 h - 4 h lieferte gute Ergebnisse. Die Microarrays werden unter Lichtausschluss zweimal für 5 min mit PBST-6H7 gewaschen. Vor dem Scannen wurden die Slides mit Druckluft getrocknet.

### 2.5.1. Optimiertes Protokoll für das 6H7 Aptamer

#### 1. Aktivierung der Aptamere

- Das Aptamer (50 nmol) wird in 450 µl Selektionspuffer (PBS-6H7) gelöst. Es wird eine Lösung aus 250 nmol Cyanurchlorid in Acetonitril zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Überschüssiges Cyanurchlorid wird durch intensives Umpuffern in PBS-6H7 entfernt.

#### 2. Immobilisierung der aktivierten Aptamere

- Das Aptamer wird in PBS-6H7 verdünnt. Konzentrationen von 100 µM und mehr erbringen gute Ergebnisse.
- Die Aptamerlösungen werden mit 5 hits/dot auf PEI- oder GAPS-modifizierte Microarray-Oberflächen gedruckt. Dabei wird je Spot ein Volumen von 500 pl übertragen.
- Die Microarrays werden über Nacht dunkel und trocken gelagert.

#### 3. Umpolung der Oberfläche

- Die Slides werden für 5 min in einer Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 ml DMSO und 1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9,4 inkubiert.
- Anschließend wird mit ddH<sub>2</sub>O gespült und zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 4. Blockieren der Oberfläche

- Die Slides werden für 30 min in 1% BSA in PBS-6H7 blockiert
- Es wird 5 min mit PBS-6H7 gewaschen.

#### 5. Falten der Aptamere

- Im Aptamer vorhandene Sekundärstrukturen werden durch Denaturierung zerstört. Dazu werden die Slides mit kochendem Wasser übergossen und für 1 min inkubiert. Dieser Schritt ist optional, führt jedoch zu besseren Signalen.

## 2. *Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays*

- Die korrekte Faltung des Aptamers wird durch 30 min inkubieren in PBST-6H7 erreicht.

### 6. Bindung des Target-Proteins

- Eine Hybridisierungskammer wird auf den Slide aufgebracht. Dabei muss beachtet werden, dass der bedruckte Bereich des Microarrays nicht austrocknet.
- Die Hybridisierungskammer wird mit der Probe, die das nachzuweisende Protein enthält gefüllt. Dabei werden 800 µl verwendet, die Probe wird zuvor in PBST-6H7 verdünnt.
- Die Bindung des Targets wird bei 20°C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 1 h - 4 h liefert gute Ergebnisse.

### 7. Waschen

- Die Slides werden freigelegt und unter Lichtausschluss zweimal für 5 min mit PBST-6H7 gewaschen.
- Vor dem Scannen werden die Slides mit Druckluft getrocknet.

## 2.6. Übertragung des Protokolls auf weitere Aptamere

### 2.6.1. Übertragung auf das 6H5 Aptamer

Die gegen den His-Tag gerichteten, am 5' Ende Amino-modifizierten Aptamere 6H5 und 6H7 wurden nach dem optimierten Protokoll (molares Verhältnis Aptamer zu Cyanurchlorid: 1 zu 5; verwendeter Puffer: PBS-6H7) mit Cyanurchlorid aktiviert und in PBS-6H7 auf Konzentrationen von 500, 400, 300, 250, 100 und 50 µM verdünnt. Die so vorbereiteten Aptamere wurden mit 5 hits/dot in 10 Replikaten auf PEI-modifizierte Microarray-Substrate gespottet. Die Slides wurden über Nacht bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Die Umpolung der Slides erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.5 beschrieben. Direkt im Anschluss an die Umpolung wurden die Slides nach dem für das 6H7 Aptamer optimierten Protokoll (Abschnitt 2.5.1) weiterverarbeitet. Dabei wurde die Inkubation mit Cy3 markiertem Bgl-His (5 µg/ml) für 4 h durchgeführt.

### 2.6.2. Übertragung auf das miniStrep Aptamer

Die Versuche mit dem miniStrep-Aptamer wurden zunächst nach dem für das 6H7-Aptamer entwickelten und optimierten Protokoll durchgeführt. Dabei wurde die Aktivierung des miniStreps in SBB durchgeführt und dieser Puffer auch für die Immobilisierung verwendet. Alle Waschschritte sowie die Inkubation mit dem Target-Protein, die für das 6H7-Aptamer in PBS-6H7 durchgeführt wurden, wurden in dem Selektionspuffer des miniStrep-Aptamers durchgeführt (150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0).

### 2.6.2.1. Anpassung des Protokolls für das miniStrep Aptamer

Um das miniStrep-Aptamer nach Aktivierung und Immobilisierung in die zur Target-Erkennung nötige dreidimensionale Struktur zu falten, wurde das für 6H7-Aptamer entwickelte Protokoll angepasst. Dabei wurde vor allem die während der SELEX verwendete Methode zur Denaturierung und Faltung des miniStrep-Aptamers auf das Microarray-Protokoll übertragen. Bittker et al. (2002) denaturierten für 5 min bei 95°C in ddH<sub>2</sub>O und schreckten die Oligonukleotide für 5 min auf Eis ab, bevor in dem Selektionspuffer gefaltet wurde. [9] Um diese Methode auf die auf Microarrays immobilisierten Aptamere zu übertragen, wurden die Microarrays nach dem Umpolen der Oberfläche mit kochendem ddH<sub>2</sub>O übergossen und für 5 min inkubiert. Die Slides wurden im Anschluss für 5 min in Eiswasser inkubiert und dann für 30 min im miniStrep-Selektionspuffer geschüttelt. Erst dann erfolgte das Blocken der Oberfläche (1 h, 1% BSA in Selektionspuffer). Nach den Bindungsstudien mit dem fluoreszenzmarkierten Target (1h, 8 µg/ml Streptavidin in Selektionspuffer) wurde zweimal für 5 min mit dem Selektionspuffer gewaschen.

### 2.6.2.2. Aufnahme einer Kinetik

Das miniStrep-Aptamer wurde in SBB aktiviert, die aktivierten Aptamere wurden in einer Konzentration von 300 µM mit 10 hits/dot auf PEI-modifizierte Oberflächen gespottet. Es wurden Bindungsstudien mit Cy3-markiertem Streptavidin (5 µg/ml in Selektionspuffer; 20°C) durchgeführt und die Signalintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Target bestimmt. Die Bindung des Targets an das miniStrep scheint nach 4 h abgeschlossen zu sein. Diese Inkubationsdauer wurde für alle folgenden Versuche übernommen.

### 2.6.2.3. Aufnahme der Temperaturabhängigkeit

Um die Temperaturabhängigkeit des miniStrep-Aptamers zu bestimmen, wurde die Temperatur während der Inkubation mit Cy3-markiertem Streptavidin (5 µg/ml) variiert. Die Inkubation wurde für 4 h durchgeführt. Dabei wurden Temperaturen von 10, 20, 30 und 40°C getestet.

### 2.6.2.4. Optimiertes Protokoll für das miniStrep-Aptamer

#### 1. Aktivierung der Aptamere

- Das Aptamer (50 nmol) wird in 450 µl SBB gelöst. Es wird eine Lösung aus 250 nmol Cyanurchlorid in Acetonitril zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Überschüssiges Cyanurchlorid wird durch intensives Umpuffern in SBB entfernt.

#### 2. Immobilisierung der aktivierten Aptamere

- Das Aptamer wird in SBB verdünnt. Konzentrationen von 100 µM und mehr erbringen gute Ergebnisse.
- Die Aptamerlösungen werden mit 5 hits/dot auf PEI-modifizierte Microarray-Oberflächen gedruckt. Dabei wird je Spot ein Volumen von 500 pl übertragen.

## 2. *Verwendete Methoden: Entwicklung von Aptamer-basierten Microarrays*

- Die Microarrays werden über Nacht dunkel und trocken gelagert.

### 3. Umpolung der Oberfläche

- Die Slides werden für 5 min in einer Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 ml DMSO und 1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9,4 inkubiert.
- Anschließend wird mit ddH<sub>2</sub>O gespült und zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

### 5. Falten der Aptamere

- Im Aptamer vorhandene Sekundärstrukturen werden durch Denaturierung zerstört. Dazu werden die Slides mit kochendem Wasser übergossen und für 5 min inkubiert. Direkt im Anschluss werden die Slides für 5 min in Eiswasser gegeben.
- Die korrekte Faltung des Aptamers wird durch 30 min inkubieren in 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 erreicht.

### 4. Blockieren der Oberfläche

- Die Slides werden für 30 min in 1% BSA in 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 blockiert.

### 6. Bindung des Target-Proteins

- Eine Hybridisierungskammer wird auf den Slide aufgebracht. Dabei muss beachtet werden, dass der bedruckte Bereich des Microarrays nicht austrocknet.
- Die Hybridisierungskammer wird mit der Probe die das nachzuweisende Protein enthält gefüllt. Dabei werden 800 µl verwendet, die Probe wird zuvor in 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 verdünnt.
- Die Bindung des Targets wird bei 20°C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 4 h ist ausreichend.

### 7. Waschen

- Die Slides werden freigelegt und unter Lichtausschluss zweimal für 5 min mit 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 gewaschen.
- Vor dem Scannen werden die Slides mit Druckluft getrocknet.

### 2.6.3. Übertragung auf das anti-Daunomycin Aptamer

Das gegen das Toxin Daunomycin entwickelte Aptamer wurde nach dem für das 6H7-Aptamer entwickelten Protokoll aktiviert, auf UltraGAPS immobilisiert und nach Umpolung der Oberfläche und Denaturierung in kochendem ddH<sub>2</sub>O in Selektionspuffer gefaltet. Es erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 µg/ml - 1 ng/ml) Daunorubicin. Zusätzlich wurden das 6H5-Aptamer sowie das miniStrep\* Oligonukleotid als Negativ-Kontrollen verwendet. Das 40 mer 6H5 und das 39 mer miniStrep\* wurden in einer Konzentration von 100 µM gespottet, das anti-Daunorubicin Aptamer (80mer) in einer Konzentration von 50 µM, um eine vergleichbare Basen-Dichte auf der Microarray-Oberfläche zu erreichen. Die Bindungsstudien mit Daunomycin wurden für 1 h bei 20°C durchgeführt.

## 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von Protein-Microarrays, auf denen Aptamere als immobilisierte Fängermoleküle verwendet werden. Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt dabei auf der Entwicklung eines für Aptamere universell einsetzbaren Microarray-Substrates sowie einer Strategie zur Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer Aktivität. Als Modellsystem wurden dabei zunächst Aptamere, die gegen den in der Biotechnologie weit verbreiteten His-Tag gerichtet sind sowie verschiedene His-getaggte Proteine verwendet. Das mit dem Modellsystem entwickelte Protokoll wurde darüber hinaus auf andere Aptamere übertragen. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Bemühungen dargestellt und diskutiert. Detaillierte Beschreibungen der Versuchsbedingungen befinden sich in Abschnitt 2 ab Seite 91.

### 3.1. His-getaggte Proteine und Aptamere gegen den His-Tag als Modellsystem

Für die Entwicklung der Microarrays wurden zunächst die bereits bekannten, der Patentschrift US 2005/0142582 A1 entnommenen, gegen den His-Tag gerichteten DNA Aptamere 6H7 und 6H5 verwendet, welche die folgenden Sequenzen aufweisen: [27]

6H7: 5' GCT ATG GGT GGT CTG GTT GGG ATT GGC CCC GGG AGC  
TGG C 3'

6H5: 5' GGC TTC AGG TTG GTC TGG TTG GGT TTG GCT CCT GTG  
TAC G 3'

Die beiden Aptamere wurden in einem Phosphatpuffer (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5) selektiert, welcher im folgenden mit PBST-6H7 (ohne Zusatz von Tween 20: PBS-6H7) abgekürzt wird. Als Linker-Systeme zur Immobilisierung der Aptamere auf Microarray-Substraten wurden die in der DNA-Chiptechnologie gebräuchlichen 5' C6-NH<sub>2</sub> und 3' C7-NH<sub>2</sub> Modifikationen verwendet.

#### 3.1.1. Bereitstellung der verwendeten Proteine

Als Interaktionspartner für die Aptamere wurden verschiedene His-getaggte Proteine verwendet. Die Expression der Proteine erfolgte in *E. coli*, die Proteine wurden über Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography*; IMAC) aufgereinigt.

Tabelle 3.1.: Auflistung der verwendeten His-getaggtten Proteine. Die Plasmide zur Expression der Esterasen wurden von Prof. Uwe Bornscheuer (Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt, der Stamm *E. coli* JM109 pET-bgl-his von Prof. Karl Friehs (Universität Bielefeld).

Protein	Kurzbezeichnung	MW (kDa)	produzierender Stamm
$\beta$ -Glucanase	Bgl-His	26	<i>E. coli</i> JM109 pET-bgl-his
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I	PFEI-His	30	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	BSE-His	32	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase	pNBE-His	54	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase	BSTE-His	31	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702

### 3.1.1.1. Transformation und Expression

Transformationen wurden nach der TSS-Methode (vgl. Abschnitt 2.1.1) durchgeführt. Alle Kultivierungen wurden in LB-Medium nach Zugabe von Ampicilin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt, die Induktion erfolgte bei Bgl-His mit IPTG (1 mM) bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5. Die Expression der Esterasen erfolgte nach Induktion mit Rhamnose (0,2%). Nach der Kultivierungen wurden die Bakterien von den Kulturüberständen durch Zentrifugation abgetrennt. Die His-getaggtten Esterasen werden intrazellulär exprimiert, zur Gewinnung des Lysates wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Da Bgl-His extrazellulär vorliegt, kann hier die Aufreinigung direkt aus dem Kulturüberstand erfolgen.

### 3.1.1.2. Aufreinigung

Die Aufreinigung der His-getaggtten Proteine wurde mittels IMAC durchgeführt. Dabei wurden mit Iminodiessigsäure (*Iminodiacetic Acid*, IDA) funktionalisierte Membranadsorber als Chromatographiemedium eingesetzt. Diese Membranen können mit unterschiedlichen Metallen beladen werden und es wurde zunächst ein *Screening* nach dem Metall durchgeführt, über das die beste Aufreinigung erzielt werden kann. Dieses *Screening* wurde mit einem modularen System durchgeführt und wurde von Kökpınar et al. (2006) publiziert. [81] Der Aufreinigungserfolg über die verschiedenen Metalle wurde mittels SDS-PAGE und kapillarelektrophoretisch mit dem Bioanalyzer (Agilent) überprüft. Nach Auswahl des geeigneten Metallions erfolgte ein Up-Scale auf Sartobind IDA 75 Einheiten (Sartorius Stedim Biotech) und die Proteinaufreinigung wurde mittels FPLC durchgeführt. Exemplarisch ist



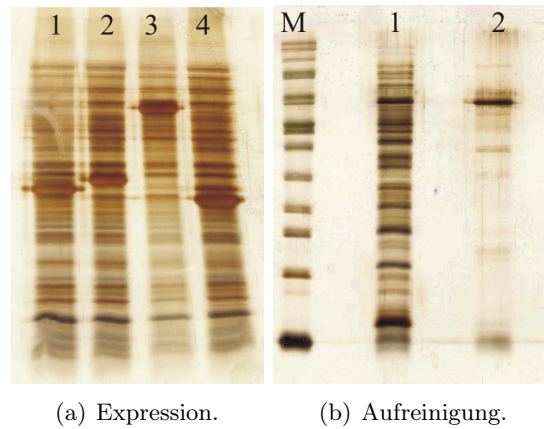


Abbildung 3.1.: (a) Nachweis der Expression der His-getagten Esterasen mittels SDS-PAGE. (1) BSTE-His; (2) BSE-His; (3) pNBE-His; (4) PFEI-His. (b) Aufreinigung von pNBE: (M) Molekulargewichtsstandard, (1) *E. coli* Lysat, (2) aufgereinigtes pNBE.

in Abbildung 3.1 (b) die Aufreinigung von pNBE aus *E. coli* Lysat über  $\text{Co}^{2+}$  dargestellt.

### 3.1.1.3. Fluoreszenzmarkierung der Proteine

Um die Bindung des Targetproteins an die auf Microarray-Substraten immobilisierten Aptamere nachweisen zu können, wurden die aufgereinigten His-getagkten Proteine mithilfe der NHS-funktionalisierter Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 markiert. [149] Dabei muss ein geeignetes Verhältnis von Farbstoff zu Protein (*Dye to Protein Ratio*; D/P) erhalten werden. Ein zu schwaches Labeling führt zu niedrigen Signalintensitäten und somit zu hohen Nachweisgrenzen. Ein zu starkes Labeling kann dagegen zu einer Verringerung des dynamischen Bereichs des Microarrays sowie zur Störung von Epitopen des Proteins führen. Es sollte also immer empirisch bestimmt werden, ob das Labeling mit der molekularen Erkennung des Proteins durch das verwendete Fängermolekül interferiert. [18] Collett et al. (2005) beobachteten, dass manche Aptamere bei der Markierung des Targets mit Cy3 bzw. Cy5 eines der Fluorophore deutlich bevorzugen. So zeigte ein anti-Lysozym Aptamer bei einem Cy3-markierten Lysozym eine 42-fach höhere Signalintensität als bei einem Cy5-markierten Lysozym, obwohl sich die beiden Farbstoffe lediglich in 2 C Atomen unterscheiden. [21] Daraus folgt, dass die Labelingstrategie vorsichtig gewählt werden muss und die gelabelten Proteine vor der Durchführung von Zweifarben-Experimenten einzeln validiert werden müssen.

Zur Markierung mit Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet. Das Protokoll, das in diesem Kit enthalten ist, ist jedoch für das Labeling von Antikörpern optimiert und erbrachte bei der Markierung von Bgl-His keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Dieser Umstand wurde auch von Cho et al. (2006) beschrieben. [18] Um das Verhältnis von Farbstoff zu Protein zu steigern, wurde das Protokoll optimiert. Zur Optimierung des Protokolls wurde Bgl-His in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet und mit Cy3 NHS-Ester zur Reaktion gebracht. Dabei wurden ausgehend vom Standardprotokoll des Kit-Herstellers das Verhältnis von Farbstoff zum Protein während der Labelingreaktion variiert und es wurden unterschiedliche pH-Werte sowie der Einfluss

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

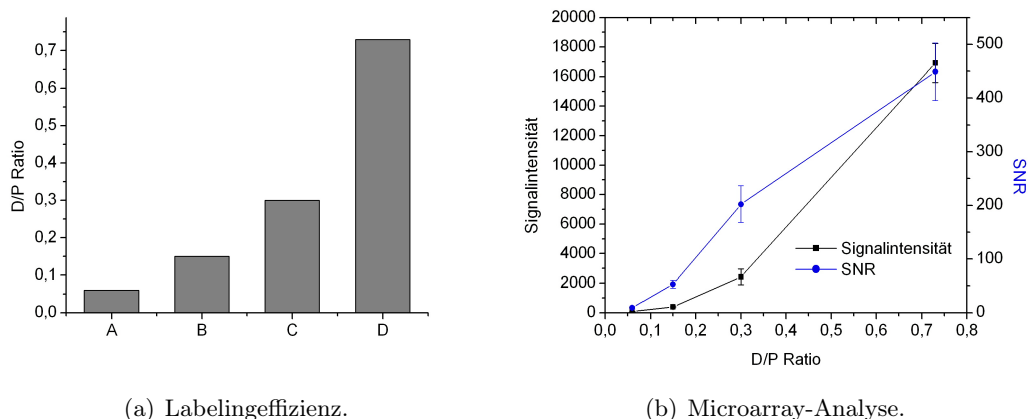


Abbildung 3.2.: (a) Einfluss des Verhältnisses zwischen Protein und Farbstoff während des Labeling von Bgl-His mit Cy3 NHS-Ester auf die Labelingeffizienz. Farbstoffkonzentrationen im Vergleich zu der vom Hersteller empfohlenen Konzentration: A: 0,5-fach, B: 1-fach, C: 2-fach, D: 5-fach. (b) Signalintensität und SNR im Antikörper-basierten Microarray-Experiment in Abhängigkeit von der erzielten D/P.

der Reaktionszeit auf die Labeling-Effizienz untersucht. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde die D/P berechnet, zusätzlich wurde das gelabelte Bgl-His auf einem mit Antikörpern gegen den His-Tag bedrucktem Protein-Microarray hinsichtlich der resultierenden Signalintensität und -qualität untersucht. Somit konnte beurteilt werden, ob die molekulare Erkennung des His-Tags durch die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigt wird.

Eine Erhöhung des Farbstoffgehaltes in der Reaktionsmischung um den Faktor 5 im Vergleich zu den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen führt zu einem Anstieg der D/P um 480% (Abb. 3.2 (a)). Im Microarray-Experiment konnte nachgewiesen werden, dass der His-Tag auch nach dem Labeling vom Antikörper erkannt wird. Da der Antikörper und die Aptamere 6H5 und 6H7 gegen das selbe "Epitop" - den His-Tag - gerichtet sind, sollten also auch die Aptamere an das gelabelte Protein binden können. Durch Erhöhung der Farbstoffkonzentration um den Faktor 5 während der Labeling-Reaktion konnte die Signalintensität im Microarray-Experiment um den Faktor 42 und die SNR um den Faktor 8 erhöht werden (Abb. 3.2 (b)). Der Einfluss des pH-Wertes auf die Labelingeffizienz wurde ebenfalls bestimmt. Dabei wurde der pH Bereich zwischen 7,0 und 9,5 untersucht. Der Einfluss des pH war nicht so gravierend wie der Einfluss des Verhältnisses zwischen Protein und Farbstoff, die besten Labelingausbeuten wurden bei pH 9,5 erzielt. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss der Reaktionsdauer auf die Labelingeffizienz untersucht (Daten nicht gezeigt). Eine Reaktionsdauer von 1 h ist ausreichend, längere Reaktionszeiten erbringen keine höheren Labelingeffizienzen. Das optimierte Protokoll ist in Abschnitt 2.1.3.4 auf Seite 97 detailliert dargestellt.

### 3.1.2. Charakterisierung der verwendeten Aptamere

#### 3.1.2.1. Vorhersage der Sekundärstruktur

Die Sekundärstrukturen der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Computerprogramms RNAfold<sup>1</sup> aus dem Vienna-RNA-Package der Universität Wien unter Verwendung von DNA-Faltungsparametern nach SantaLucia et al. (1998) berechnet. [142, 64] Die beiden Aptamere weisen eine Sequenzübereinstimmung von 65% auf, die übereinstimmenden Bereiche sind in Abbildung 3.3 grau unterlegt dargestellt. Trotz dieser Sequenzübereinstimmung ergeben sich für die beiden Aptamere sehr unterschiedliche Sekundärstrukturen. Neben der wahrscheinlichsten Sekundärstruktur wurde auch die Freie Energie und die Schmelztemperatur  $T_M$  berechnet. Für das 6H7-Aptamer ergab sich dabei eine Freie Energie von -4,1 kcal/mol und  $T_M = 67,4^\circ\text{C}$ . Die berechnete Sekundärstruktur für das 6H5-Aptamer ist mit einer Freien Energie von -2,8 kcal/mol und einer Schmelztemperatur von  $45,2^\circ\text{C}$  weniger stabil.

Es sollte an dieser Stelle jedoch angemerkt werden, dass RNAfold lediglich kanonische Basenpaarungen berücksichtigt. Ungewöhnliche Strukturelemente wie z.B. G-Quartetts und *Mismatch* Paarungen, wie sie in Aptameren häufiger vorkommen (vgl. Abschnitt 1.3 auf Seite 77), werden durch dieses Programm nicht erfasst.

#### 3.1.2.2. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Bestimmung der Affinität der Aptamere gegenüber ihrem Target wurde mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (*Isothermal Titration Calorimetry*; ITC) am Department of Food Technology and Biotechnology des Technion Haifa in Kooperation mit Professor Yuval Shoham durchgeführt. Dazu wurde das 6H5 Aptamer verwendet, welches vor der Messung in PBST-6H7 gelöst wurde, für 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt wurde und anschließend auf  $4^\circ\text{C}$  abgekühlt wurde, um eine korrekte Faltung des Aptamers zu erreichen.

Mittels ITC konnte die Bindung des 6H5-Aptamers an die ausgewählten His-getaggten Proteine eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Dabei konnten  $K_a$  Werte zwischen  $10^6$  und  $10^7$  M bestimmt werden. Für monoklonale Antikörper werden mittels ITC üblicherweise  $K_a$  Werte von  $10^9$  ermittelt. Die Affinität des Aptamers gegenüber His-getaggten Proteinen konnte also nachgewiesen werden, allerdings fällt sie eher niedrig aus. Die eher mäßige Affinität des Aptamers gegenüber dem His-Tag lässt sich dadurch erklären, dass der His-Tag als Peptid dem Aptamer nur eine geringe mögliche Kontaktfläche bietet und die Bindung durch die große Flexibilität des Peptids erschwert wird. Dieselben Faktoren diskutierte bereits Larry Gold in Bezug auf die Affinität von anti-Peptid Aptameren. [52]

Auffällig ist darüber hinaus die Diskrepanz zwischen den  $K_a$  Werten, die für verschiedene Proteine bestimmt wurden. Offensichtlich wird die Affinität auch durch das Protein, welches mit dem Tag fusioniert wurde beeinflusst. Möglicherweise spielen dabei elektrostatische Effekte eine Rolle: Das Aptamer verfügt als Oligonukleotid über ein negativ geladenes

<sup>1</sup><http://rna.tbi.univie.ac.at/RNAfold>

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

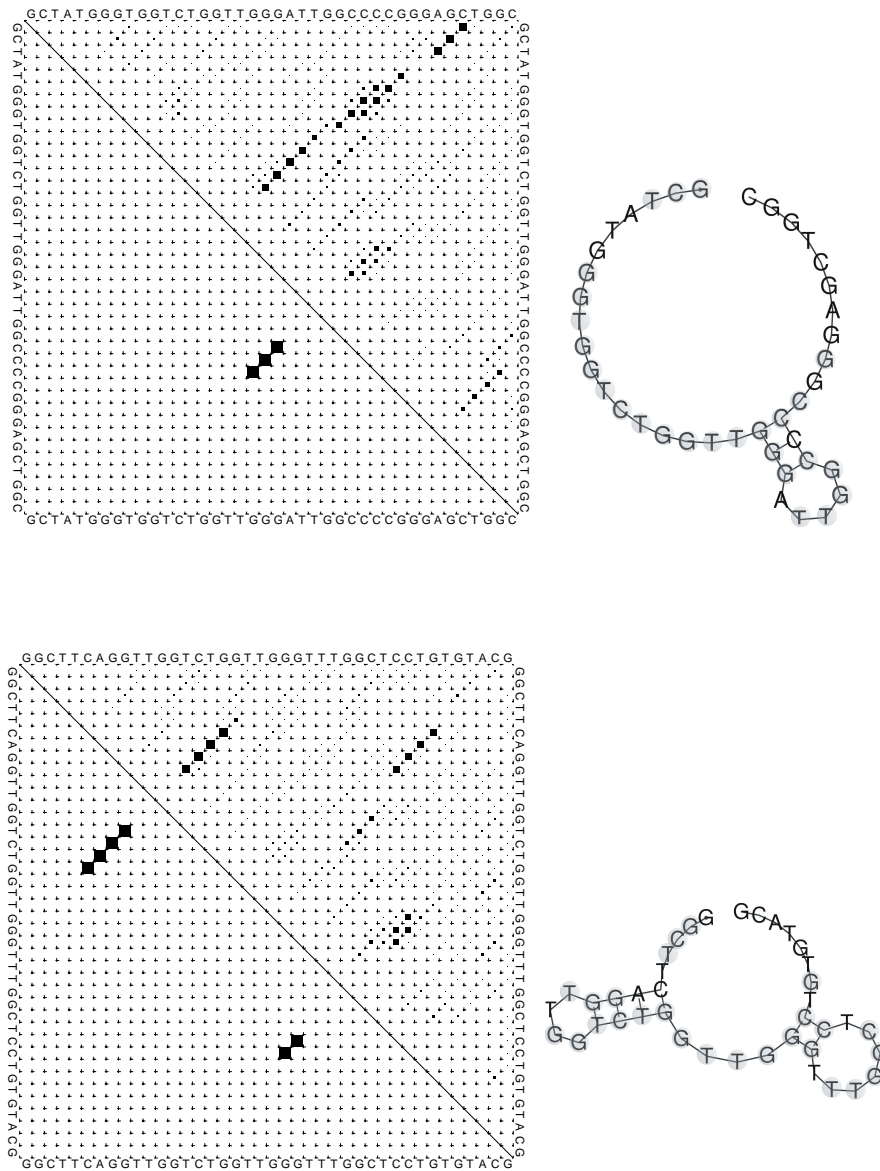


Abbildung 3.3.: Dot-Blot der Wahrscheinlichkeit von Basenpaaren in den Sequenzen von 6H7 (oben) und 6H5 (unten) sowie die wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen der beiden Aptamere.

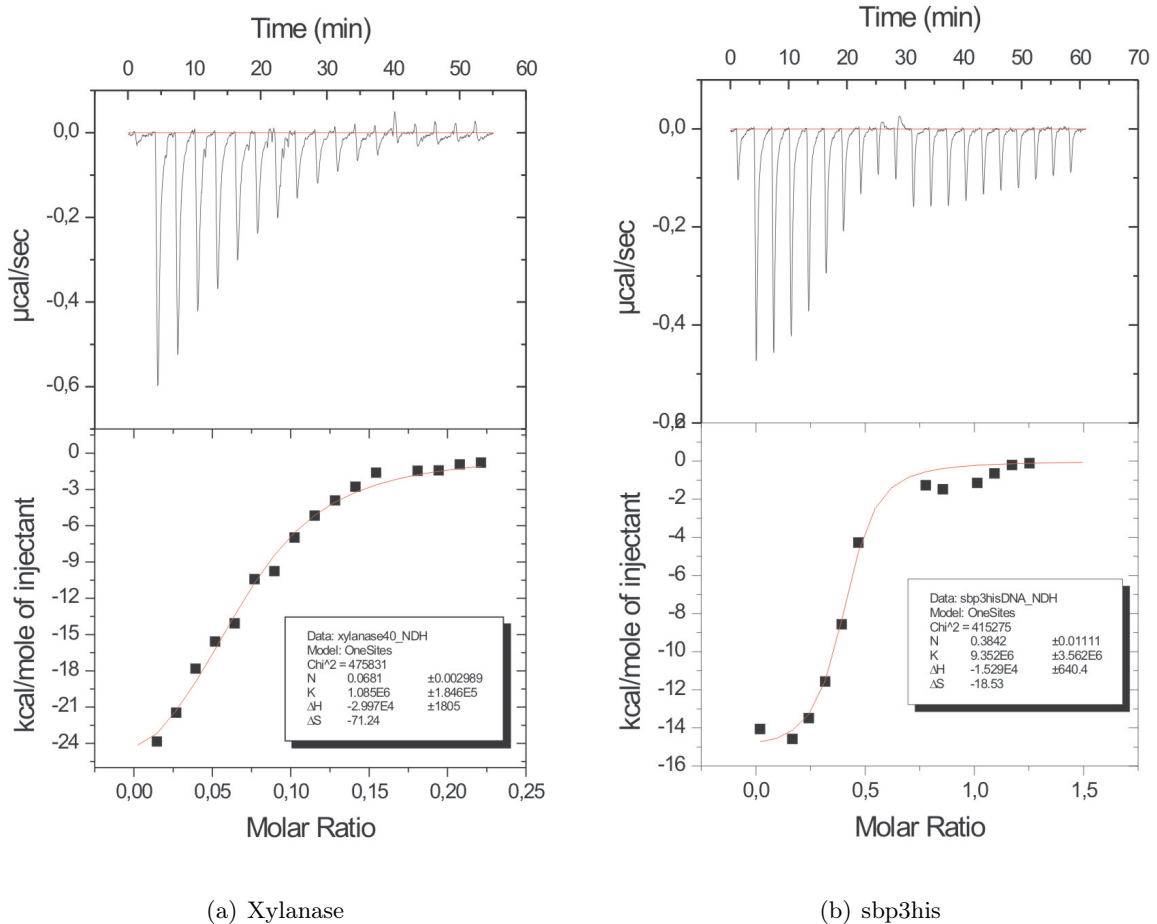


Abbildung 3.4.: Rohdaten und Ergebnisse der ITC Messungen.

Phosphatrückgrad, welches empfindlich auf negative Ladungen auf der Proteinoberfläche in Nähe des Tags reagieren könnte. Darüber hinaus dürften auch sterische Effekte eine Rolle spielen und das Aptamer eine höhere Affinität gegenüber His-getaggten Proteinen aufweisen, wenn der Tag leicht zugänglich ist.

### 3.1.2.3. Oberflächenplasmon Resonanz

Mittels ITC konnte die Bindung des 6H5 Aptamers an His-getaggte Proteine in Lösung nachgewiesen werden. Aptamere, die ihr Target in Lösung erkennen, können auf einer Oberfläche immobilisiert jedoch ihre Funktionstüchtigkeit einbüßen. Um zu überprüfen, ob die gegen den His-Tag gerichteten Aptamere auch nach Immobilisierung an einer Oberfläche fähig sind, ihr Target zu erkennen, wurden Oberflächenplasmon Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*; SPR) Experimente durchgeführt. Dazu wurden das 6H5 und 6H7 Aptamer auf einen NHS-aktivierten Goldsensorchip aufgebracht. Die Aptamere wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von His-getaggttem PFEI in PBST-6H7 inkubiert und die SPR-Senseogramme aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Aptamere mit 1% SDS regeneriert. Zum Vergleich wurden analoge Messungen mit immobilisiertem Antikörper durchgeführt. In diesem Falle erfolgte Regeneration mit HCl. Die

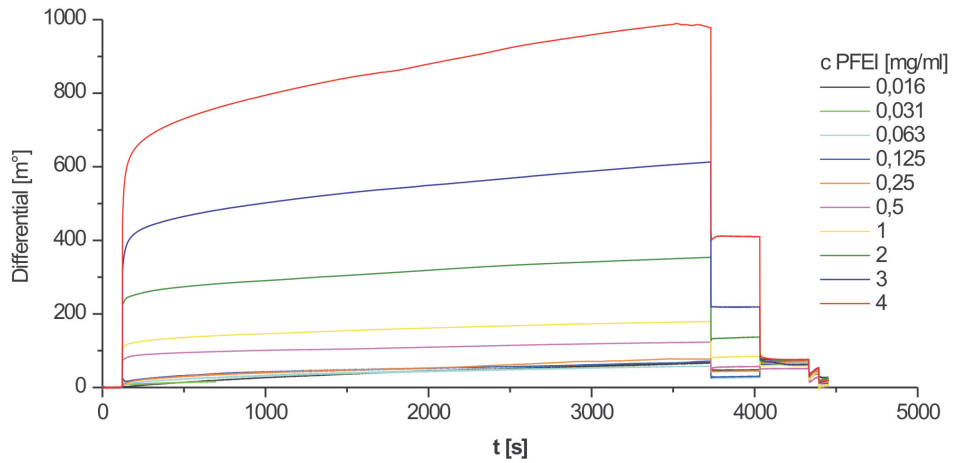
Messungen wurden am Institut für Pflanzengenetik, Abteilung II - Pflanzenbiotechnologie der Universität Hannover mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Reinard durchgeführt, eine detaillierte Versuchsdurchführung befindet sich in Abschnitt 2.2.2.

Sowohl für das 6H5 als auch das 6H7 Aptamer konnte die Funktionalität nach Immobilisierung mittels SPR nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Antikörper wurden dabei höhere Signale erhalten. Ein direkter Vergleich zwischen den Messungen mit den Aptameren und dem Antikörper ist jedoch nicht möglich. Zum einen ist die effektiv auf der Oberfläche immobilisierte Konzentration an Fängermolekül nicht bekannt. Darüber hinaus spielt noch ein weiterer Faktor für die Höhe des SPR-Signals eine Rolle: Das Aptamer ist wesentlich kleiner als der Antikörper. Dadurch findet das Bindungsereignis zwischen Fänger und Targetprotein beim Aptamer in größerer Nähe zur Oberfläche statt als beim immobilisierten Antikörper. Bei der SPR werden Änderungen im Evaneszenten Feld der Oberflächenenergie des Goldfilms der Sensoroberfläche gemessen. Dieses Evaneszente Feld fällt mit der Entfernung zur Oberfläche exponentiell ab. Somit werden Bindungsereignisse in größerer Entfernung zur Oberfläche einen geringeren Einfluss auf das SPR-Signal ausüben, als Bindungsereignisse nahe der Oberfläche.

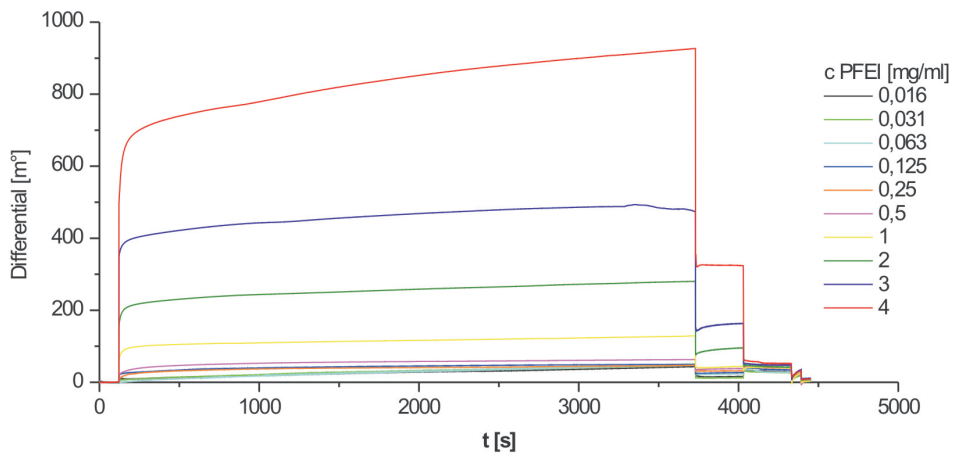
Um dennoch einen Vergleich zwischen Antikörper und Aptameren anstellen zu können, wurden aus den SPR-Senseogrammen Bindungsisothermen bestimmt. Dazu wurden für jede Konzentration die maximalen SPR Signale (*Equilibrium Response*,  $R_{eq}$ ) berechnet und gegen die Konzentration des Targets aufgetragen. In den so erhaltenen Bindungsisothermen ergibt sich für niedrige Targetkonzentrationen ein ähnlicher Verlauf für das 6H7- und das 6H5-Aptamer und den Antikörper. Bei hohen Konzentrationen an Targetprotein ergeben sich für die Aptamere höhere  $R_{eq}$  Werte als für den Antikörper. Auch hierfür könnten jedoch die oben ausgeführten Überlegungen zum Abstand zur Oberfläche und der effektiven Dichte an Fängermolekül an der Oberfläche ausschlaggebend sein.

Auch wenn sich aus den SPR-Experimenten keine quantitativen Rückschlüsse über die Affinität der immobilisierten Aptamere gegenüber His-getaggtten Proteinen ziehen lassen, konnte die Möglichkeit zur Immobilisierung dieser Aptamere unter Erhalt ihrer aktiven Konformation demonstriert werden.

### 3.1. His-getaggte Proteine und Aptamere gegen den His-Tag als Modellsystem



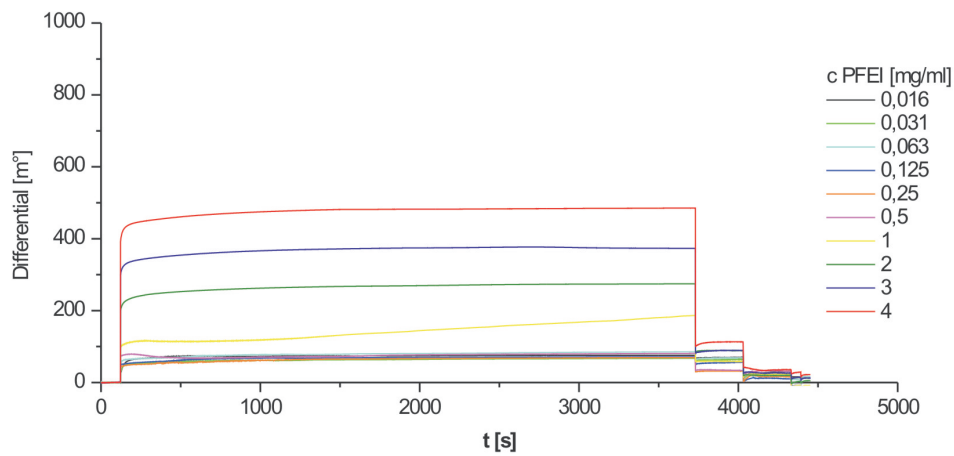
(a) 6H7



(b) 6H5

Abbildung 3.5.: SPR-Senseogramme für 6H5 und 6H7. Aufgetragen ist der Verlauf des gegen eine Referenzzelle aufgenommene Signals gegen die Zeit.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays



(a) Antikörper

Abbildung 3.6.: SPR-Senseogramm für den Antikörper. Die Messung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Messungen mit den Aptameren 6H5 und 6H7.

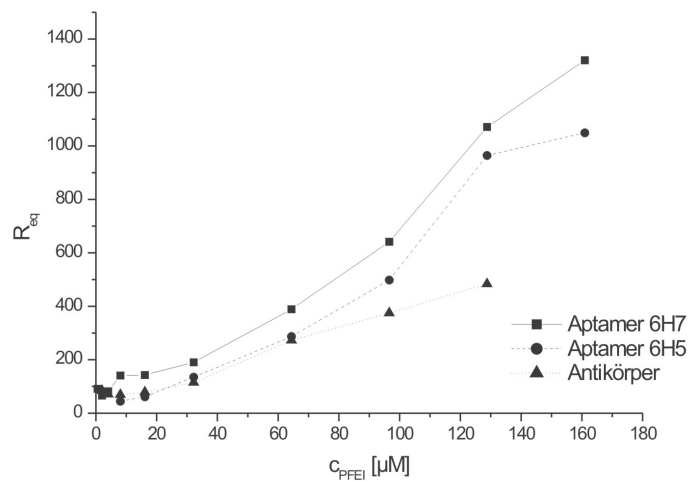


Abbildung 3.7.: Mittels SPR bestimmte Bindungsisothermen der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 sowie eines gegen den His-Tag gerichteten Antikörpers gegenüber dem His-getaggtten Protein PFEI.



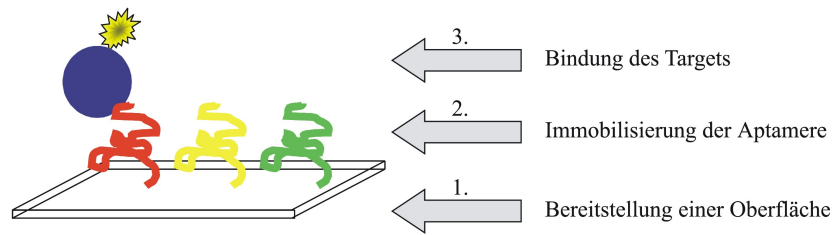


Abbildung 3.8.: Darstellung der verschiedenen Entwicklungsstufen eines Aptamer-basierten Microarrays.

## 3.2. Protokollentwicklung

Nachdem die Funktionalität der immobilisierten Aptamere mittels SPR nachgewiesen wurde, wurden Versuche im Microarray-Format durchgeführt. Die Entwicklung eines aptamer-basierten Microarrays lässt sich dabei in mehrere Stadien einteilen (vgl. Abb. 3.8):

1. Zunächst muss ein geeignetes Substrat bereitgestellt werden. Die Oberfläche muss über entsprechende Modifikationen verfügen, um zur Bindung des Aptamers fähig zu sein.
2. Auf dieser Oberfläche wird das Aptamer immobilisiert. Dabei darf die Immobilisierungsstrategie nicht mit der korrekten Faltung des Aptamers interferieren.
3. Ein Protokoll zur Prozessierung der Microarrays muss entwickelt werden. Dieses Protokoll umfasst alle der Immobilisierung der Aptamere folgenden Schritte inklusive einer geeigneten Methode zur Bindung des Targets.

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Stufen der Microarray-Entwicklung dargestellt. Dazu wurde zunächst das 6H7-Aptamer verwendet. Zunächst wurden geeignete Microarray-Oberflächen gesucht, sowie unterschiedliche Immobilisierungsmethoden getestet. Der Nachweis der Aptamerimmobilisierung auf den Substraten erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green II, der spezifisch an ssDNA und in geringerem Maße an dsDNA bindet. [8] Der Nachweis der Funktionalität des immobilisierten Aptamers erfolgte durch die Bindung des fluoreszenzmarkierten Targets.

### 3.2.1. Immobilisierung von Aptameren auf unterschiedlichen Oberflächen

Da es sich bei Aptameren um Oligonukleotide handelt, erscheint es nahe liegend, Aptamere auf Substraten, die in der DNA-Chiptechnologie gebräuchlich sind, zu immobilisieren. So werden z.B. Aldehyd- oder Epoxy-modifizierte Microarray-Substrate in der DNA-Chiptechnologie erfolgreich eingesetzt.

Es wurden Versuche zur Immobilisierung der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 durchgeführt. Dazu wurde ein Standardprotokoll für DNA-Microarrays verwendet, welches an die speziellen Anforderungen eines Aptamers angepasst wurde. So wurde ein Denaturierungsschritt eingeführt, welcher das Aptamer linearisiert, bevor durch Inkubation in dem Puffer, welcher bei der Selektion des Aptamers eingesetzt wurde, das Aptamer in die zur Targeterkennung benötigte dreidimensionale Struktur gefaltet wurde. Dieser Puffer wurde auch in allen folgenden Waschschrinen und bei der Inkubation mit dem

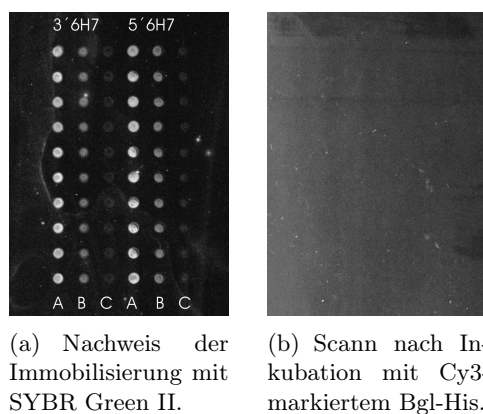


Abbildung 3.9.: Versuch zur Entwicklung eines Aptamer-basierten Microarrays auf Aldehyd-modifizierten Substraten. Die Immobilisierung des Aptamers konnte mittels Sybr Green II nachgewiesen werden, eine Bindung des Target-Proteins konnte nicht beobachtet werden. Gespottet wurden jeweils 500 µl Aptamerlösung der folgenden Konzentrationen: (A) 100 µM, (B) 10 µM, (C) 1 µM.

fluoreszenzmarkierten Target (8 µg/ml Bgl-His, Cy3-markiert) verwendet (Protokoll siehe Abschnitt 2.3.2 auf Seite 102).

Die Immobilisierung der Aptamere konnte mittels Sybr Green II-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Es konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch keine Bindung des Targetproteins an das Aptamer detektiert werden. Um das immobilisierte Aptamer in seine korrekte dreidimensionale Struktur zu überführen, wurden verschiedene Methoden zur Denaturierung und Faltung des Aptamers getestet. Um vorliegende Sekundärstrukturen in den Aptamern zu zerstören, wurden die Aptamere bei 95°C denaturiert und direkt im Anschluss in ihrem Selektionspuffer abgekühlt. [5, 20] Außerdem wurden Versuche zur Denaturierung mit 7 M Harnstoff und anschließende Inkubation in Selektionspuffer durchgeführt [20] und auch EDTA wurde als Reagenz zur Denaturierung der Aptamere getestet. Keiner dieser Versuche führte zu einem positiven Ergebnis in den Targetbindungsstudien (Daten nicht gezeigt). Obwohl Stadtherr et al. (2005) in ihrer Veröffentlichung die Funktionalität des anti-Thrombin-Aptamers sowie des anti-IgE-Aptamers auf Aldehyd-Oberflächen nachweisen konnten, [152] konnten diese Ergebnisse unter Verwendung der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

Der Versuch wurde unter Verwendung von Epoxy-modifizierten Microarray-Substraten wiederholt, auch bei diesem Versuch konnte trotz erfolgreicher Immobilisierung des Aptamers keine Targetbindung beobachtet werden. Offensichtlich ist es also möglich, Aptamere auf Aldehyd- oder Epoxy-modifizierten Oberflächen zu immobilisieren. Allerdings wiesen die hier untersuchten Aptamere 6H5 und 6H7 auf diesen Oberflächen keine Aktivität auf.

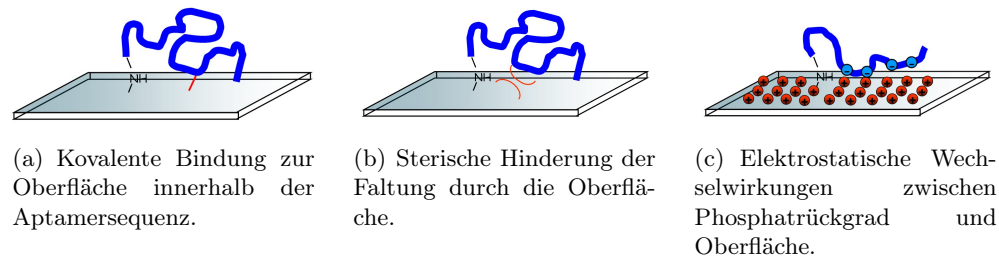


Abbildung 3.10.: Darstellung der unterschiedlichen Faktoren, die die korrekte Faltung des Aptamers behindern können.

### 3.2.2. Probleme bei der Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer aktiven Konformation

Die oben beschriebenen Probleme bei der direkten Übertragung von Methoden aus der DNA-Chiptechnologie auf aptamerbasierte Microarrays deuten an, dass es grundlegende Unterschiede zwischen herkömmlichen Oligonukleotiden und Aptameren gibt. So ist es bei der Entwicklung von Aptamer-Microarrays nicht nur notwendig, dass das Aptamer immobilisiert wird, es muss auf der Oberfläche auch die Möglichkeit haben, sich in die korrekte dreidimensionale Struktur zu falten. Diese Möglichkeit scheint für das 6H5 und das 6H7 Aptamer auf den hier verwendeten Aldehyd- und Epoxy-Slides nicht zu bestehen.

Als Ursache für diese “Faltungsproblematik” kommen verschiedene Faktoren in Frage (vgl. Abb. 3.10):

1. Bei Verwendung besonders reaktiver Oberflächen zur Immobilisierung kann es nicht nur zur Bindung des Aptamers über den terminalen Linker kommen, sondern auch zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen reaktiven Gruppen der Oberfläche und Funktionen innerhalb der Aptamersequenz.
2. Außerdem kann die Faltung eines Aptamers, welches in zu geringem Abstand zur festen Oberfläche immobilisiert wurde, sterisch behindert werden. Hier kann auch die Orientierung des Aptamers eine Rolle spielen.
3. Schließlich können auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Oberfläche eine korrekte Faltung verhindern. Dies tritt vor allem bei Verwendung von positiv geladenen Oberflächen auf, welche mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrad des Aptamers elektrostatisch wechselwirken können, wodurch sich das Aptamer flach an die Oberfläche anlegt.

### 3.2.3. Ansätze zur Lösung der Faltungsproblematik

Im Folgenden werden die oben beschriebenen Faktoren, die einen Einfluss auf die Aktivität von immobilisierten Aptameren ausüben können, systematisch untersucht.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

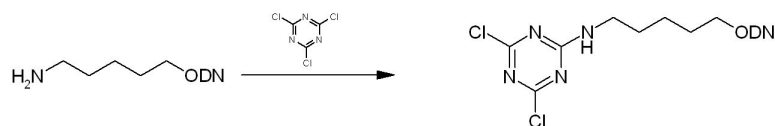


Abbildung 3.11.: Aktivierung eines Aptamers (ODN, *Oligodeoxy Nucleotid*) mit Cyanurchlorid.

#### 3.2.3.1. Gerichtete Immobilisierung von Aptameren

Eine mögliche Ursache der oben beschriebenen Faltungsproblematik ist die hohe Reaktivität der verwendeten Aldehyd- bzw. Epoxy-modifizierten Oberflächen. Dadurch kann das Aptamer auch über verschiedene funktionelle Gruppen innerhalb seiner Sequenz an die Oberfläche gebunden werden. Um dieses Problem zu vermeiden, wurde eine Strategie gesucht, die es ermöglicht, Aptamere ausschließlich über ihren terminalen Linker auf einer weniger reaktiven Amino-modifizierten Oberfläche zu immobilisieren.

##### 3.2.3.1.1. Aktivierung von Aptameren mit Cyanurchlorid

Um Aptamere in gerichteter Form an Amino-modifizierte Oberflächen zu binden, müssen sie zunächst so modifiziert werden, dass sie mit der eher unreaktiven Amino-Funktion reagieren können. Ausgehend von Aptameren mit einem terminalen Amino-Linker ist eine solche Aktivierung mit Cyanurchlorid möglich (Abb. 3.11). Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-Triazin) enthält 3 acyl-analoge Chloratome und ist dadurch zur Reaktion mit primären Aminogruppen fähig. [47] Nach Van Ness et al. (1991) verläuft die Aktivierung von Oligonukleotiden mit Cyanurchlorid dabei ausschließlich über den terminalen Amino-Linker und nicht innerhalb der Nukleobasen des Oligonukleotids. [162] Somit ermöglicht die Aktivierung von Aptameren mit Cyanurchlorid ihre gerichtete Immobilisierung. Die Aktivierung wurde in Natriumborat-Puffer (*Sodiumborate Buffer*, SBB, pH 8,3) mit Amino-modifiziertem 6H7 durchgeführt (Durchführung siehe Abschnitt 2.4.1 auf Seite 103).

##### 3.2.3.1.1.1. Immobilisierung der aktivierten Aptamere auf Amino-modifizierten Oberflächen

Das aktivierte gegen den His-Tag gerichtete Aptamere 6H7 wurde an auf einer Oberfläche gebundene Aminogruppen gekoppelt (Abb. 3.12). Als Microarray-Oberfläche wurden dabei GAPS- (Gamma Amino-Propylsilan) modifizierte Substrate verwendet. Neben der besseren Kontrolle der Immobilisierungsorientierung über die terminale Modifikation des Aptamers weist die Verwendung des aktivierten Aptamers außerdem den Vorteil auf, dass das Cyanurchlorid einen zusätzlichen *Spacer* darstellt, wodurch eine korrekte Faltung des Aptamers besser gewährleistet werden kann. Das 6H7 Aptamer wurde sowohl mit am 3' als auch am 5' Ende modifiziert und aktiviert und in Microarray-Experimenten eingesetzt.

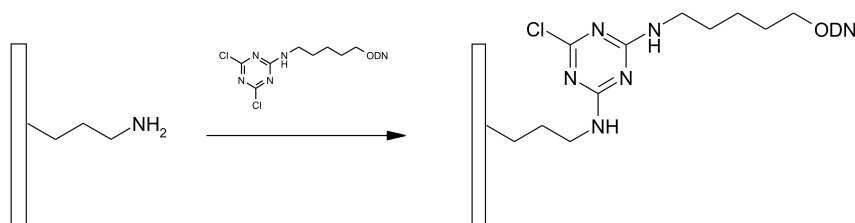


Abbildung 3.12.: Kopplung des aktivierten Aptamers an Amino-funktionalisierte Oberflächen.

### 3.2.3.2. Bereitstellung eines zusätzlichen Spacers

Wie bereits beschrieben, kann es zu Faltungsproblemen des Aptamers kommen, wenn dieses in zu geringem Abstand zur Oberfläche immobilisiert vorliegt und dadurch die Ausbildung seiner dreidimensionalen Struktur sterisch behindert wird. Dieses Problem kann durch Bereitstellung eines zusätzlichen *Spacers* zwischen Aptamer und Oberfläche umgangen werden. Zusätzlich zu den Experimenten mit GAPS-Oberflächen wurden deshalb parallel Versuche mit zusätzlichen *Spacern* durchgeführt. Dazu wurden Aldehyd-modifizierte Slides mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet (siehe Abb. 3.13). Das verzweigte PEI weist dabei primäre, sekundäre und tertiäre Amino-Gruppen (ca. 30% :40% :30%) auf. Das am 3' und am 5' Ende Amino-modifizierte 6H7 Aptamer wurde auf GAPS- und PEI-modifizierte Oberflächen gespottet und die Immobilisierung mit Sybr Green II untersucht.

Die Immobilisierung der aktivierten Aptamere konnte auf beiden Oberflächen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Dabei wurde auf der PEI Oberfläche eine höhere Signalintensität erreicht als auf der GAPS Oberfläche. PEI dient also nicht nur als *Spacer*, es erhöht durch seine große Anzahl von funktionellen Gruppen auch die Bindungs-Kapazität der Oberfläche. [150, 91]

Es wurden Bindungsstudien zwischen dem aktivierten und immobilisierten 6H7 und Cy3-markiertem Bgl-His durchgeführt. Dazu wurden die Slides zunächst für 30 min mit 1% BSA in PBS-6H7 blockiert. Anschließend wurden sie für 5 min mit PBS-6H7 gewaschen, bevor die Aptamere für 1 min in kochendem ddH<sub>2</sub>O denaturiert wurden. Die Faltung der linearisierten Aptamere erfolgte durch 10-minütige Inkubation in PBST-6H7. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 8 µg/ml Cy3 Bgl-His in PBST-6H7 bei 20°C für 1 h. Vor dem Trocknen und Scannen wurde zweimal für 5 min mit PBST-6H7 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Auf dem GAPS-Slide konnte die Bindung des Target-Proteins eindeutig nachgewiesen werden. Auf dieser Oberfläche konnte außerdem ein ausgeprägter Orientierungseffekt beobachtet werden: Während das 3' modifizierte Aptamer negative Signale liefert, konnten für das 5' modifizierte Aptamer Signale mit einer SNR von über 14 nachgewiesen werden (100 µM 5'6H7). Einen Einfluss der Orientierung des Aptamers konnten Baldrich et al. (2004) bereits für das anti-Thrombin Aptamer nachweisen. [5] Dieser Effekt muss jedoch für jedes Aptamer und auch jede verwendete Oberfläche empirisch bestimmt werden. So beobachteten Cho et al. (2006) lediglich einen geringen Einfluss der Orientierung bei Verwendung von biotinyliertem anti-Thrombin Aptamer auf Streptavidin-modifizierten Oberflächen. [18]

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

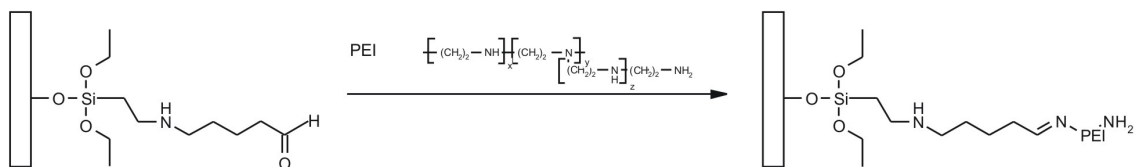


Abbildung 3.13.: Beschichtung von Aldehyd-modifizierten Oberflächen mit PEI.

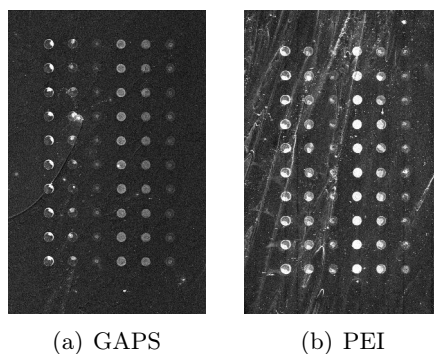


Abbildung 3.14.: Nachweis der Immobilisierung des aktivierten 6H7-Aptamers auf GAPS und PEI mit Sybr Green II. Von links nach rechts wurden folgende Aptamere und Konzentrationen gespottet: 1) 3'6H7, 100  $\mu$ M; 2) 3'6H7, 10  $\mu$ M; 3) 3'6H7, 1  $\mu$ M; 4) 5'6H7, 100  $\mu$ M; 5) 5'6H7, 10  $\mu$ M; 6) 5'6H7, 1  $\mu$ M. Beide Scans wurden bei gleicher Laserstärke und gleichem Gain aufgenommen.

Auf dem PEI-Slide konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Signale detektiert werden, obwohl laut Sybr Green II Färbung auf dieser Oberfläche die Aptamere in hoher Dichte immobilisiert vorlagen. Eine mögliche Ursache dafür ist die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und der positiv geladenen PEI-Oberfläche. So beschrieben auch Collett et al. (2005), dass bestimmte Oberflächen wie z.B. Polylysin nicht zur Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer aktiven Konformation geeignet sind. Als Ursache dafür vermuteten sie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativen Phosphatrückgrad und der positiven Microarray-Oberfläche. [20] Im Folgenden wurde daher versucht, die GAPS- und PEI-Oberflächen vor der Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Targetprotein in eher negativ geladene Oberflächen zu überführen.

#### 3.2.3.3. Umpolung der Oberfläche

Um die positiven Amino-modifizierten Oberflächen in negativ geladene Oberflächen umzuwandeln, wurden die Amino-Gruppen mit Bernsteinsäureanhydrid behandelt (Abb. 3.16). Dadurch gewinnt die Oberfläche an ionischem Charakter und wird von leicht positiv zu stark negativ umgepolt, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrad des Aptamers und der Oberfläche unterbunden werden.

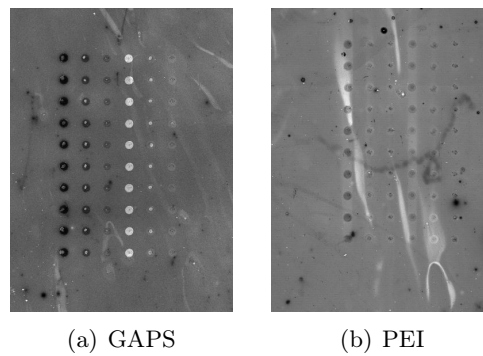


Abbildung 3.15.: Nachweis der Bindung des Cy3-markierten Targetproteins. Das Spottingmuster entspricht dem in Abb. 3.14 beschriebenen. Der GAPS Slide wurde bei Gain 650 gescannt, der PEI Slide bei Gain 500.

Die Slides wurden zum Umpolen für 5 min in einer basischen Bernsteinsäureanhydrid-Lösung (0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 ml DMSO und 1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9,4) inkubiert. Anschließend wurde mit ddH<sub>2</sub>O gespült und zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Bindungsstudien wurden wie in Abschnitt 3.2.3.2 auf Seite 123 beschrieben mit 8 µg/ml Cy3-markiertem Bgl-His durchgeführt. Auf dem GAPS-Slide konnten nach Umpolung der Oberfläche für das 5' modifizierte 6H7 sehr gute Signale mit einer SNR von 186 erhalten werden (Abb. 3.17). Dies entspricht im Vergleich zu den Signalen, die ohne Umpolung der Oberfläche gewonnen werden, einer Steigerung um 1229%. Wie bereits bei den Versuchen ohne Umpolung der Oberfläche konnte auch in diesem Versuch eine Abhängigkeit der Funktionalität des Aptamers von der Orientierung des Aptamers auf der GAPS-Oberfläche beobachtet werden. Während das 5' modifizierte Aptamer exzellente Signale liefert, fällt das 3' modifizierte Aptamer auch nach Umpolung der Oberfläche vollständig aus.

Für den PEI Slide ergibt sich ein völlig anderes Bild. Während auf dem nicht umgepolten Slide (Abb. 3.15) keine Signale detektiert werden konnten, sind auf der PEI-Oberfläche nach Umpolung sowohl das 3'- als auch das 5'-modifizierte Aptamer aktiv (Abb. 3.17). Die Ursache dafür ist in dem langen *Spacer* zu sehen. Offensichtlich neigt das 6H7 Aptamer bei Immobilisierung über sein 3'-Ende eher zu sterischen Hinderungen. Dieser hohe sterische Anspruch fällt auf der GAPS-Oberfläche, die nur über einen kurzen *Spacer* verfügt, eher ins Gewicht und führt zum Totalausfall dieses Aptamers. Auf der PEI-Oberfläche minimiert der große zusätzliche *Spacer* die sterischen Einflüsse. In Übereinstimmung mit der Sybr Green II-Färbung (Abb. 3.14) werden auf dem PEI-Slide höhere absolute Signalintensitäten erreicht, was auf eine höhere Dichte an immobilisiertem Aptamer zurückzuführen ist.

Im Vergleich zu den in Abb. 3.15 dargestellten Scans fällt außerdem eine deutliche Reduktion des Hintergrundes durch das Umpolen der Oberfläche auf. Die nach Umpolung deutlich negative Oberfläche kann durch BSA offensichtlich effektiver blockiert werden als die nur leicht positiven GAPS- und PEI-Oberflächen.

Als Resultat einer Erhöhung der Signalintensität in Kombination mit einer Verminderung des Hintergrundes können auf dem GAPS- und dem PEI-Slide nach Umpolung gute SNR-Werte erreicht werden (Abb. 3.18).

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

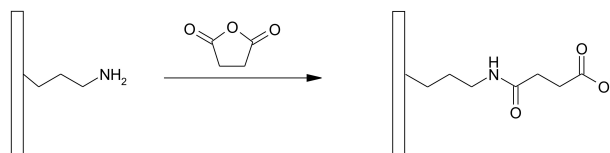


Abbildung 3.16.: Umpolung der GAPS- und PEI-Oberflächen mit Bernsteinsäureanhydrid.

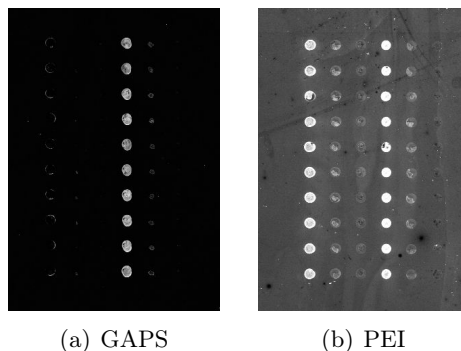


Abbildung 3.17.: Bindungsstudien von Cy3-markiertem Bgl-His an GAPS- und PEI-Oberflächen. Gespottet wurde aktiviertes 6H7-Aptamer in dem selben Spottingmuster wie in Abbildung 3.14 beschrieben. Vor der Inkubation mit dem Target-Protein wurde die Oberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid umgepolt. Beide Scans wurden bei gleichen Lasereinstellungen und bei dem gleichen Gain erstellt.

#### 3.2.4. Optimierung des Protokolls

Ein wesentlicher Schritt des bisher entwickelten Protokolls ist die Verwendung von Cyanurchlorid-aktivierten Aptamern. Aufgrund der entscheidenden Bedeutung dieser Reaktion wurde eine Optimierung der Aktivierung durchgeführt.

##### 3.2.4.1. Optimierung der Aktivierung und Immobilisierung

Ein entscheidender Faktor bei der Aktivierung des Aptamers mit Cyanurchlorid ist das molare Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid. Die Versuche wurden mit  $100 \mu\text{M}$  5'6H7 in SBB durchgeführt. Die Konzentration an Aptamer wurde konstant gehalten, die Konzentration Cyanurchlorid wurde variiert, so dass molare Verhältnisse von Aptamer zu Cyanurchlorid von 1:0,5; 1:1; 1:5 und 1:100 verwendet wurden. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Cyanurchlorid wurde durch exzessives Umpuffern in SBB entfernt. Die aktivierten Aptamere wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (250, 100, 50, 10 und  $1 \mu\text{M}$ ) mit 5 hits/dot auf PEI-Slides gespottet. Die Immobilisierungseffizienz für die unter unterschiedlichen Bedingungen aktivierten Aptamere wurde mittels Sybr Green II Färbung bestimmt (Abb. 3.19 (a)). Dabei steigt die relative Signalintensität mit steigender Konzentration von Cyanurchlorid in der Reaktionslösung stark an. Mit steigender Cyanurchloridkonzentration kann also der Anteil des



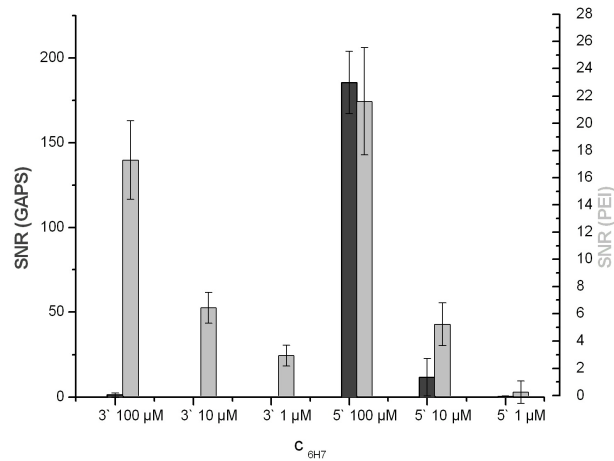


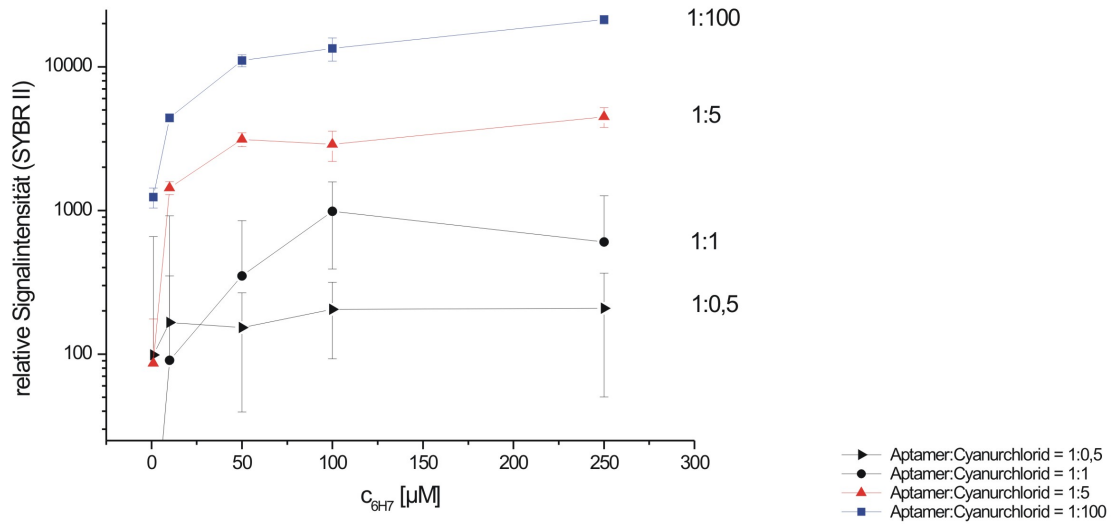
Abbildung 3.18.: SNR-Analyse für aktiviertes 6H7 auf GAPS (dunkelgrau) und PEI (hellgrau) nach Umpolung der Oberfläche.

aktivierten Aptamers und somit auch der Menge des immobilisierten Aptamers deutlich gesteigert werden.

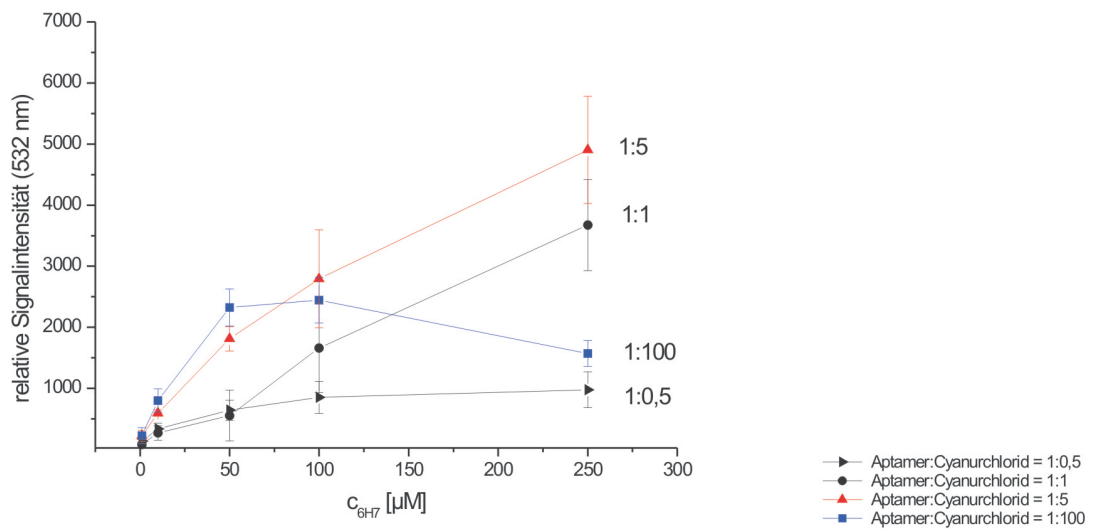
Entscheidend für den Erfolg eines aptamerbasierten Microarray-Experiments ist jedoch nicht ausschließlich die Dichte des immobilisierten Aptamers, sondern vor allem die Fähigkeit des immobilisierten Aptamers, sein Target erkennen und binden zu können. Daher wurden Studien zur Bindung von Cy3-markierten Bgl-His (8  $\mu$ g/ml) durchgeführt. Die mit verschiedenen Verhältnissen von Aptamer zu Cyanurchlorid aktivierten Aptamere wurden wie oben beschrieben auf PEI-Oberflächen gespottet, die Oberflächen umgepolt und nach dem bisher entwickelten Protokoll bearbeitet. Die Inkubationszeit mit dem Target betrug 1 h. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb 3.19 (b) dargestellt.

Für die Effizienz der Targetbindung ergibt sich ein anderes Bild als für die Immobilisierungseffizienz: Während bei der Immobilisierungseffizienz die im molaren Verhältnis 1:100 aktivierten Aptamere die höchsten relativen Signalintensitäten lieferten, zeigen diese Aptamere im Hybridisierungsexperiment nur noch bei niedrigen gespotteten Konzentrationen (bis zu 50  $\mu$ M) die besten relativen Signalintensitäten. Bei höheren gespotteten Aptamerkonzentrationen (größer als 100  $\mu$ M) kommt es sogar zu einer Abnahme der relativen Signalintensität. Offensichtlich führt die erhöhte Aktivierungseffizienz und die dadurch bedingte höhere Immobilisierungsdichte dazu, dass die Aptamere in so hoher Dichte auf der Oberfläche vorliegen, dass eine Bindung des Targetproteins nur noch eingeschränkt möglich ist. So könnte es sein, dass sich die Aptamere gegenseitig durch sterische oder elektrostatische Effekte in der Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur behindern. Bei Aptameren, die in sehr großer Dichte immobilisiert wurden, ist es zudem möglich, dass es zu intermolekularen Basenpaarungen kommt, welche eine korrekte Faltung des Aptamers behindern. Die besten relativen Signalintensitäten nach Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Target wurden bei einem molaren Verhältnis von 1:5 beobachtet. Bei diesem Verhältnis wurde zwar eine geringere Dichte an immobilisiertem Aptamer auf der Oberfläche nachgewiesen als bei einem molaren Verhältnis von 1:100, allerdings ist die effektive Dichte an funktionalem Aptamer bei einem Verhältnis von 1:5 höher.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

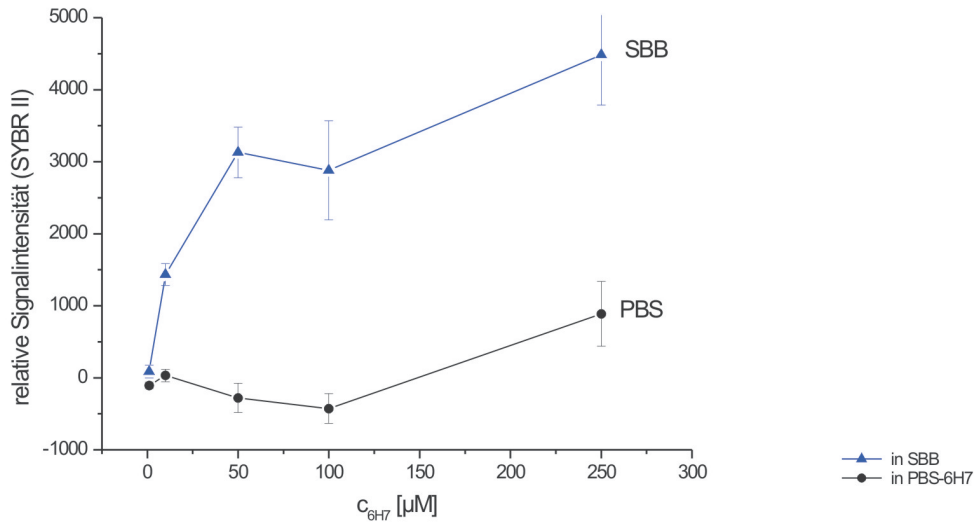


(a) Immobilisierungseffizienz.

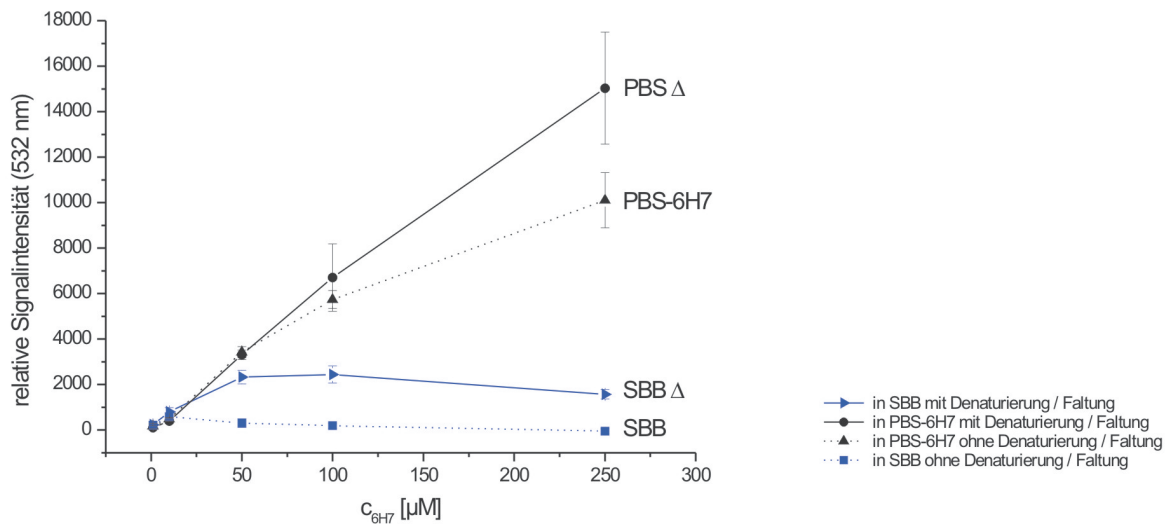


(b) Effizienz der Targetbindung.

Abbildung 3.19.: Immobilisierungseffizienz (a) und Effizienz der Targetbindung (b) in Abhängigkeit von den Aktivierungsbedingungen und der Konzentration des Aptamers beim Spotten. Variiert wurde das molare Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid während der Aktivierung.



(a) Immobilisierungseffizienz.



(b) Effizienz der Targetbindung.

Abbildung 3.20.: Immobilisierungseffizienz (a) und Effizienz der Targetbindung (b) in Abhängigkeit von dem zur Aktivierung des Aptamers und zum Spotten verwendeten Puffer. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Hitzebehandlung der Slides zum Denaturieren und Falten des Aptamers notwendig ist, um eine Bindung des Targets zu ermöglichen.

Neben dem molaren Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid ist auch der Puffer, in welchem die Aktivierung und die Immobilisierung durchgeführt werden, entscheidend. Üblicherweise werden die Aktivierungen von Amino-modifizierten Nukleinsäuren mit Cyanurchlorid im basischen durchgeführt. [162] Prinzipiell können die Aptamere jedoch in jedem Puffer aktiviert werden, der keine Amino-Funktionen enthält, die mit dem Cyanurchlorid reagieren können. Daher kann auch der Selektionspuffer PBS-6H7 während der Aktivierung verwendet werden. Um den Einfluss des Puffers zu bestimmen, wurde das 6H7 Aptamer wie oben beschrieben in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit Cyanurchlorid aktiviert. Dabei wurden zwei parallele Ansätze verwendet, wobei eine Aktivierung in SBB und die andere in PBS-6H7 durchgeführt wurde. Verdünnungsreihen der aktivierten Aptamere wurden auf PEI-Oberflächen gespottet und die Immobilisierungseffizienz mit SYBR Green II überprüft. Zur Immobilisierung wurden dabei dieselben Puffer wie zur Aktivierung verwendet.

Wie erwartet führt die Verwendung des basischen SBB Puffers nach Sybr Green II Färbung zu höheren relativen Signalintensitäten und folglich zu höheren Oberflächen-Dichten immobilisierten Aptamers (Abb. 3.20 (a)).

Auch für die in unterschiedlichen Puffern aktivierten Aptamere wurde die Fähigkeit des immobilisierten Aptamers zur Targeterkennung durch Inkubation mit dem Cy3-markierten Bgl-His (8 µg/ml) untersucht (Abb. 3.20 (b)). Dabei wurde festgestellt, dass die Aptamere, die in ihrem Selektionspuffer aktiviert und immobilisiert wurden, höhere relative Signalintensitäten liefern als die Aptamere, die in SBB aktiviert wurden. Offensichtlich gelingt es den Aptameren, die in PBS-6H7 aktiviert und immobilisiert wurden eher, ihre aktive Konformation einzunehmen. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin begründet sein, dass die Aptamere in PBS-6H7 ihre Sekundärstruktur bereits - vollständig oder teilweise - einnehmen (vgl. Abschnitt 1.3).

Da nach Aktivierung und Immobilisierung des Aptamers in seinem Selektionspuffer offensichtlich zumindest Teile der dreidimensionalen Struktur des Aptamers bereits korrekt gefaltet vorliegen, wurden Versuche durchgeführt, die klären sollten, ob ein Denaturieren und Falten des Aptamers vor der Inkubation mit dem Target zur Bindung des Targets auch in diesem Falle erforderlich ist. Dazu wurden zwei Slides verwendet, der eine wurde nach dem bisherigen Standardprotokoll bearbeitet, bei dem anderen Slide wurde auf einen Denaturierungsschritt und ein Falten in Selektionspuffer verzichtet. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 2.5.1 (b) als gestrichelte Kurven dargestellt. Sowohl für das in SBB aktivierte als auch für das in PBS-6H7 aktivierte Aptamer können durch Denaturierung und Faltung des Aptamers höhere relative Signalintensitäten nach Inkubation mit Cy3-markiertem Bgl-His erreicht werden. Während das in SBB aktivierte und immobilisierte Aptamer ohne Denaturierung/Faltung keine Aktivität zeigt, ist das in PBS-6H7 aktivierte und immobilisierte Aptamer auch ohne Denaturierung/Faltung aktiv. Dies bestärkt die oben dargelegte Vermutung, dass das Aptamer in PBS-6H7 bereits seine korrekte Faltung oder zumindest Teile seiner aktiven Konformation einnimmt. Möglicherweise liegen zumindest Bereiche des Aptamers bereits vorgefaltet vor. Somit kann das Aptamer durch Verwendung seines Selektionspuffers während der Aktivierung und Immobilisierung in einer "funktionaleren" Form immobilisiert werden, als bei Verwendung von SBB. So

berichteteten auch Baldrich et al. (2004), dass Inkubationsbedingungen und Pufferzusammensetzungen essentiell zur Ausbildung der dreidimensionalen Struktur von Aptameren und somit zur erfolgreichen Targetbindung sind. [5] Insgesamt deuten die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass das 6H7 Aptamer den His-Tag nach dem Mechanismus der adaptiven Bindung erkennt (vgl. Abschnitt 1.3).

Die Versuche zur Optimierung der Aktivierung des 6H7 Aptamers erbrachten die folgenden Ergebnisse:

1. Das optimale molare Verhältnis von Aptamer zu Cyanurchlorid während der Aktivierung beträgt 1:5.
2. Die Aptamere zeigen bessere Targetbindungseigenschaften, wenn die Aktivierung und Immobilisierung in ihrem Selektionspuffer durchgeführt werden.
3. Bei Aptameren, die in Selektionspuffer aktiviert und immobilisiert wurden, kann prinzipiell auf einen Denaturierungs-/Faltungsschritt vor der Inkubation mit dem Target verzichtet werden. Allerdings führt die Einführung eines Denaturierungs-/Faltungsschrittes zu besseren Signalen.

Das für das 6H7 optimierte Protokoll zur Aktivierung ist detailliert in Abschnitt 3.2.4.1 auf Seite 126 dargestellt. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, dass die hier durchgeführte Optimierung der Aktivierungsbedingungen nicht unbedingt auf andere Aptamere übertragbar ist. Insbesondere die Aktivierung der Aptamere in Selektionspuffer ist nicht für alle Aptamere durchführbar, da Aptamere häufig in Tris-Puffern selektiert werden und diese Puffer (ebenso wie andere Puffer, die Amino-Funktionen enthalten) während der Aktivierung mit Cyanurchlorid nicht eingesetzt werden können.

### 3.3. Optimiertes Protokoll

Das im Rahmen der bisher vorgestellten Ergebnisse erstellte und optimierte Protokoll zur Anwendung des 6H7 Aptamers zur Detektion His-getaggter Proteine ist im Folgenden dargestellt:

#### 1. Aktivierung der Aptamere

- Das Aptamer (50 nmol) wird in 450 µl Selektionspuffer (PBS-6H7) gelöst. Es wird eine Lösung aus 250 nmol Cyanurchlorid in Acetonitril zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Überschüssiges Cyanurchlorid wird durch intensives Umpuffern in PBS-6H7 entfernt.

#### 2. Immobilisierung der aktivierten Aptamere

- Das Aptamer wird in PBS-6H7 verdünnt. Konzentrationen von 100 µM und mehr erbringen gute Ergebnisse.
- Die Aptamerlösungen werden mit 5 hits/dot auf PEI- oder GAPS-modifizierte Microarray-Oberflächen gedruckt. Dabei wird je Spot ein Volumen von 500 pl übertragen.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

- Die Microarrays werden über Nacht dunkel und trocken gelagert.

#### 3. Umpolung der Oberfläche

- Die Slides werden für 5 min in einer Lösung aus 0,275 g Bernsteinsäureanhydrid in 17 ml DMSO und 1 ml 100 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9,4 inkubiert.
- Anschließend wird mit ddH<sub>2</sub>O gespült und zweimal für 1 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 4. Blockieren der Oberfläche

- Die Slides werden für 30 min in 1% BSA in PBS-6H7 blockiert.
- Es wird 5 min mit PBS-6H7 gewaschen.

#### 5. Falten der Aptamere

- Im Aptamer vorhandene Sekundärstrukturen werden durch Denaturierung zerstört. Dazu werden die Slides mit kochendem Wasser übergossen und für 1 min inkubiert. Dieser Schritt ist optional, führt jedoch zu besseren Signalen.
- Die korrekte Faltung des Aptamers wird durch 30 minütige Inkubation in PBST-6H7 erreicht.

#### 6. Bindung des Target-Proteins

- Eine Hybridisierungskammer wird auf den Slide aufgebracht. Dabei muss beachtet werden, dass der bedruckte Bereich des Microarrays nicht austrocknet.
- Die Hybridisierungskammer wird mit der Probe die das nachzuweisende Protein enthält gefüllt. Dabei werden 800 µl verwendet, die Probe wird zuvor in PBST-6H7 verdünnt.
- Die Bindung des Targets wird bei 20°C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 1 h - 4 h liefert gute Ergebnisse.

#### 7. Waschen

- Die Slides werden freigelegt und unter Lichtausschluss zweimal für 5 min mit PBST-6H7 gewaschen.
- Vor dem Scannen werden die Slides mit Druckluft getrocknet.

### 3.3.1. Anwendung der entwickelten Methoden

#### 3.3.1.1. Detektion weiterer Proteine

Die Funktionalität des entwickelten Aptamer-basierten Microarrays wurde bisher unter Verwendung von Cy3-markiertem Bgl-His als Target-Protein getestet. Um zu demonstrieren, dass die Methode auch geeignet ist, andere His-getaggte Proteine nachzuweisen, wurden Versuche mit Cy3-markiertem PFEI-His durchgeführt. Dabei wurde das oben beschriebene optimierte Protokoll angewendet, als Fängermolekül wurde 5´modifiziertes 6H7

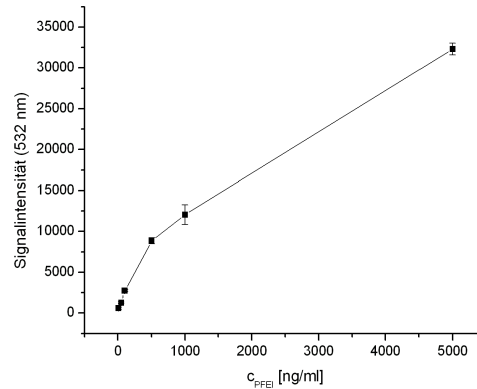


Abbildung 3.21.: Demonstration des dynamischen Bereichs des entwickelten Microarrays: Signalintensität in Abhängigkeit von der PFEI-His Konzentration.

auf GAPS eingesetzt. Die Konzentration von PFEI-His wurde in einem Bereich von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis zu 10  $\text{ng}/\text{ml}$  variiert. Dabei wurde eine gute Korrelation zwischen resultierender Signalintensität und der Konzentration des Target-Proteins beobachtet (Abb. 3.21). Die Detektion von PFEI-His gelang also und gemäß der SNR-Analyse in Abbildung 3.22 konnten Konzentrationen von 100  $\text{ng}/\text{ml}$  sicher nachgewiesen werden. Das entspricht einer Nachweisgrenze von 3,3 nM. Diese Nachweisgrenze ist im Vergleich zu den bisher veröffentlichten aptamerbasierten Microarrays recht hoch (siehe Tabelle 1.3 auf Seite 89). Dieses Ergebnis war jedoch in Hinblick auf die eher niedrige mittels ITC bestimmte Affinität des Aptamer zu erwarten (vgl. Abschnitt 3.1.2.2 auf Seite 113). Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde neben GAPS-modifizierten Oberflächen auch PEI-modifizierte Oberflächen eingesetzt. Obwohl - wie bereits für Bgl-His beobachtet - auf GAPS höhere SNR-Werte erreicht werden konnten, erbrachte die hohe Signalqualität auf den GAPS-Slides keine signifikant niedrigere LOD als bei Verwendung der PEI-Oberflächen (Abb. 3.22).

Es wurden darüber hinaus Studien zur Stabilität des immobilisierten Aptamers durchgeführt. Dazu wurden wie oben beschrieben Bindungsstudien mit PFEI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durchgeführt. Dabei wurden die Inkubationen einen Tag nach dem Spotten des 6H7 Aptamers sowie 8 und 16 Tage später nach Lagerung der bedruckten Microarrays bei Raumtemperatur durchgeführt. Beobachtet wurde dabei die Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit zwischen dem Spotten und dem Experiment (Abb. 3.23). Innerhalb der Messgenauigkeit konnte dabei keine Abnahme der Signalintensität beobachtet werden. Ein analoges Experiment wurde bereits in Teil I dieser Arbeit in Abschnitt unter Verwendung von Antikörpern beschrieben (vgl. Tabelle 3.5 auf Seite 54). Dabei konnte nach 16 Tagen eine deutliche Abnahme der Signalintensität beobachtet werden. Bei gegen den His-Tag gerichteten Antikörpern kam es dabei in Abhängigkeit vom verwendeten Microarray-Substrat nach 16 Tagen zu einer Abnahme der Signalintensität auf 64% bei Nitrocellulose-Microarrays oder sogar auf 28% bei GAPS-modifizierten Glas-Substraten. Die Überlegenheit von Aptameren gegenüber Antikörpern in Bezug auf ihre Stabilität konnte also hier bestätigt werden.

### 3. Ergebnisse: Entwicklung eines Aptamer-basierten Protein-Microarrays

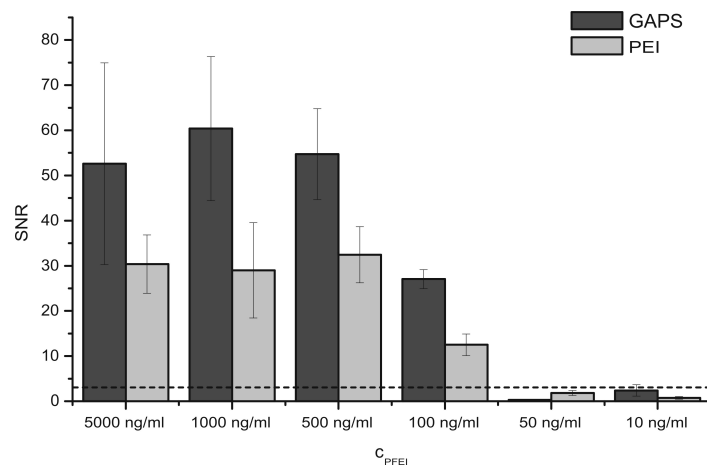


Abbildung 3.22.: Bestimmung der Nachweisgrenze für PFEI-His auf GAPS- und PEI-modifizierten Microarrays. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar.

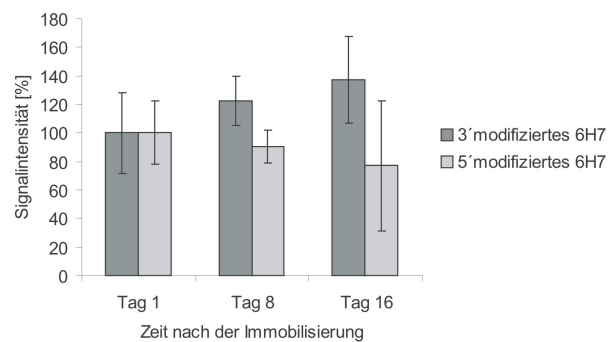


Abbildung 3.23.: Test der Stabilität des immobilisierten 6H7 im Verlauf von 16 Tagen nach der Immobilisierung.



### 3.3.1.2. Übertragung der Methoden auf die Aptamer-basierte Chromatographie

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation vorgestellten Methoden ermöglichen die Anwendung von auf festen Oberflächen immobilisierten Aptameren. Die Anwendung ist dabei nicht auf das Microarray-Format beschränkt. Im Rahmen ihrer Dissertation konnte Öznur Kökpinar die hier beschriebenen Methoden zur Aktivierung und Immobilisierung von Aptameren erfolgreich auf die Aptamer-basierte Affinitätschromatographie übertragen.<sup>2</sup> Exemplarisch sind in Abbildung 3.24 auf der nächsten Seite zwei Aufreinigungen über aptamerbeschichtete Magnetpartikel dargestellt. Zur Aufreinigung wurde das 5' Amino-modifizierte 6H7 Aptamer wie oben beschrieben mit Cyanurchlorid aktiviert. Das aktivierte Aptamer wurde mit Amino-modifizierten Magnetic Beads für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Beads drei Mal mit PBST-6H7 gewaschen. Die Proteinaufreinigungen wurden aus *E. coli*- Zellysaten, die PFEI-His bzw. pNBE-His enthielten durchgeführt. Jeweils 100 µL der Lysate wurden auf die mit 6H7 funktionalisierten Beads gegeben und für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen mit Selektionspuffer wurde zweimal mit jeweils 35 µL PBST-6H7 + 1 M Imidazol eluiert. Das Ergebnis der Aufreinigungen ist in Abbildung 3.24 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Esterasen konnte an die Beads gebunden und mit hoher Reinheit wieder eluiert werden (Spur 4 und Spur 8). Der Aufreinigungsprozess ist über Magnet Partikel Prozessoren wie z.B. das KingFisher™-System im Mikrotiterplattenformat automatisierbar.

Herkömmlicherweise wird zur Aufreinigung His-getaggter Proteine heute die IMAC eingesetzt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es während der Aufreinigung zu einer Ablösung von Metallionen von der Matrix kommt. Da viele Metalle die in der IMAC Verwendung finden carcinogen sind, sollte dieser Gesichtspunkt vor allem bei der Aufreinigung von Proteinen, die pharmazeutischen Anwendungen zugeführt werden sollen, berücksichtigt werden. Neben einer potentiellen Gesundheitsgefährdung besteht auch die Gefahr, dass die Metallionen die Oxidation des gereinigten Proteins katalysieren können. Die Verwendung von Aptamer-basierten Affinitätsmedien stellt hier also eine wertvolle Alternative zur IMAC dar.

### 3.3.2. Übertragung der entwickelten Methoden auf andere Aptamere

Die Protokollentwicklung erfolgte unter Verwendung des 6H7 Aptamers. Um zu überprüfen, ob das Protokoll auf andere Aptamere übertragbar ist, wurden zunächst Versuche mit dem 6H5 Aptamer durchgeführt. Dieses Aptamer entspringt der gleichen Selektion wie das 6H7 Aptamer. Außerdem wurde die Methode auf ein gegen Streptavidin gerichtetes Aptamer übertragen, das unter völlig anderen Bedingungen selektiert wurde. Darüber hinaus wurden Versuche mit einem gegen ein Toxin gerichteten Aptamer durchgeführt.

<sup>2</sup>Dissertation von Öznur Kökpinar, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, in Arbeit (2008)

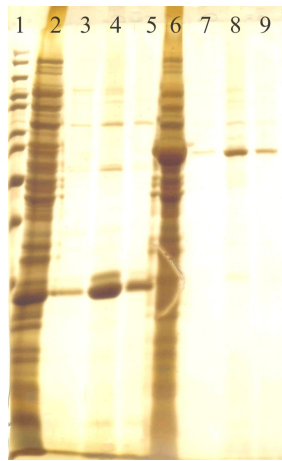


Abbildung 3.24.: SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung von His-getaggten Proteinen aus *E. coli* Lysaten über das 6H7-Aptamer. 1: Molekulargewichtsstandard, 2: PFEI-haltiges Lysat, 3: Waschfraktion, 4: 1. Elution, 5: 2. Elution, 6: pNBE-haltiges Lysat, 7: Waschfraktion, 8: 1. Elution, 9: 2. Elution.

### 3.3.2.1. Nachweis His-getaggtter Proteine mit dem 6H5 Aptamer

Die beiden Aptamere 6H5 und 6H7 wurden nach dem in Abschnitt 3.2.4.1 bestimmten, optimierten Protokoll aktiviert und auf PEI-modifizierte Microarray-Substrate gespottet. Um Slide-zu-Slide Variationen auszuschließen, wurden die beiden Aptamere dabei auf den gleichen Slide gedruckt. Die Bindungsstudien erfolgten mit 5 µg/ml Cy3-markiertem Bgl-His. Der Slide wurde nach dem für das 6H7 Aptamer entwickelten Protokoll angewendet. Abweichend von den bisherigen Experimenten wurde die Inkubation mit dem Target für 4 h durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Aptamere unter den gleichen Versuchsbedingungen aktiv sind. Die direkte Übertragung des Protokolls auf ein anderes Aptamer, welches unter den gleichen Versuchsbedingungen selektiert wurde, gelang also problemlos. Dabei zeigte das 6H5 Aptamer sogar höhere absolute Signalintensitäten als das 6H7 Aptamer (Abb. 3.25).

Neben den Bindungsstudien mit Cy3-markiertem Bgl-His wurden auch Studien zur Bindung von Cy3-markiertem PFEI-His durchgeführt (Abb. 3.26). Während bei der Bindung von Bgl-His das 6H5-Aptamer etwas höhere Signalintensitäten liefert als das 6H7-Aptamer, wird bei der Bindung von PFEI der umgekehrte Trend beobachtet. Hier zeigt das 6H7-Aptamer deutlich bessere Ergebnisse, die Signalintensität ist im Vergleich zum 6H5-Aptamer um den Faktor 2,5 erhöht. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.2 auf Seite 113 für die ITC-Messungen diskutiert wurde, ist im Falle der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere auch das Protein, an den der His-Tag fusioniert wurde, für das Ergebnis der Bindungsstudien ausschlaggebend.

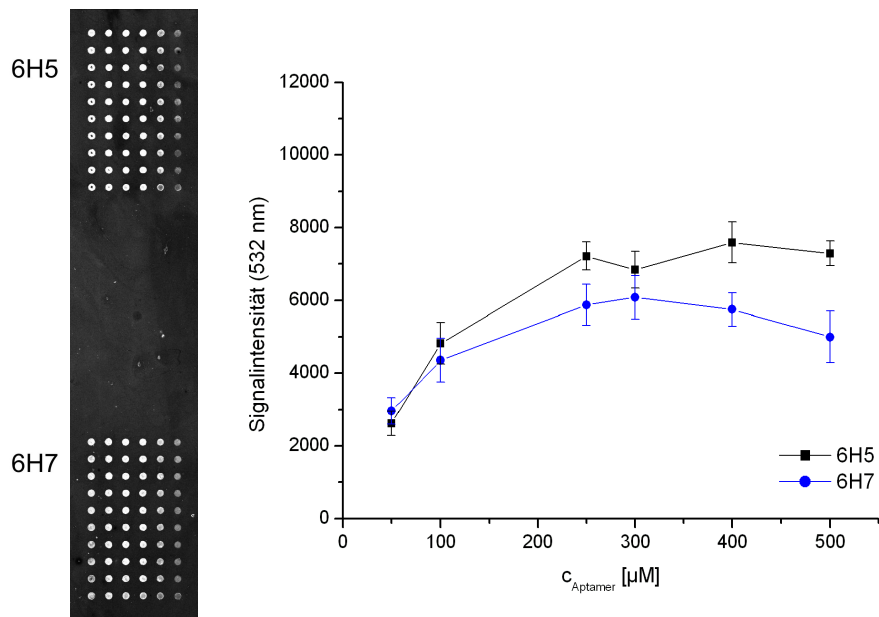


Abbildung 3.25.: Verlauf der Signalintensität für das 6H5 und das 6H7 Aptamer nach Target-Bindungsstudie mit Cy3-markiertem Bgl-His in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Aptamers.

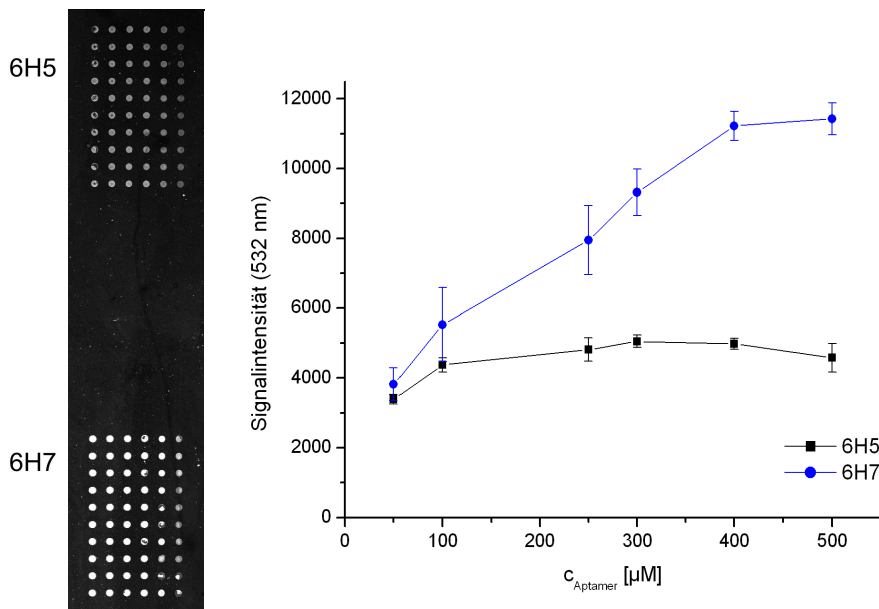


Abbildung 3.26.: Verlauf der Signalintensität für das 6H5 und das 6H7 Aptamer nach Target-Bindungsstudie mit Cy3-markiertem PFEI-His in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Aptamers.

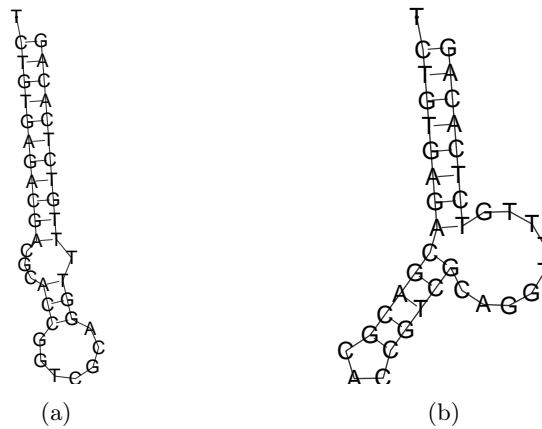


Abbildung 3.27.: Sekundärstruktur des miniStrep Aptamers (a) und der fehlerhaften Sequenz miniStrep\* (b). Die Strukturen wurden mit RNAfold berechnet. [64]

### 3.3.2.2. Aptamer-basierte Detektion von Streptavidin

Nach erfolgreicher Übertragung des Protokolls vom 6H7- auf das 6H5-Aptamer wurde versucht, das Protokoll auf ein weiteres Aptamer zu übertragen, das unter anderen Selektionsbedingungen entwickelt wurde. Dazu wurde das von Bittker et al. (2002) entwickelte, gegen Streptavidin gerichtete miniStrep Aptamer verwendet. [9] Das Aptamer wurde mittels NRR (vgl. Seite 74) entwickelt und um die zur Targetbindung nicht erforderlichen Anteile verkürzt. Das Minimal-Aptamer weist folgende Sequenz auf:

miniStrep: 5' TCT GTG AGA CGA CGC ACC GGT CGC AGG TTT TGT  
CTC ACA G '3

Das Aptamer weist eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von 105 nM auf und wurde in 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 selektiert. Zusätzlich wurden Versuche mit der fehlerhaften, um eine Base verkürzten Sequenz miniStrep\* durchgeführt, um nachzuweisen, dass die Streptavidin-Bindung spezifisch an das korrekt gefaltete miniStrep Aptamer und nicht unspezifisch an ein vergleichbares Oligonukleotid erfolgt.

miniStrep\*: 5' TCT GTG AGA CGA CGC ACC GTC GCA GGT TTT GTC  
TCA CAG '3

#### 3.3.2.2.1. Anpassung des Protokolls an das miniStrep Aptamer

Ausgehend von dem für das gegen den His-Tag gerichtete Aptamer 6H7 entwickelte Protokoll wurden Versuche mit dem miniStrep Aptamer durchgeführt. Zur Aktivierung des miniStrep-Aptamers wurde das für die His-Tag-Aptamere bestimmte optimale molare Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid von 1:5 übernommen. Die Aktivierung wurde wiederum in SBB durchgeführt, die Verwendung des Tris-haltigen Selektionspuffers ist hier nicht möglich. Die aktivierten Aptamere wurden auf PEI immobilisiert und es wurden Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Protokoll übernommen, das für die His-Tag-Aptamere entwickelt wurde, lediglich das Puffersystem wurde durch den Selektionspuffer des miniStrep-Aptamers ersetzt.

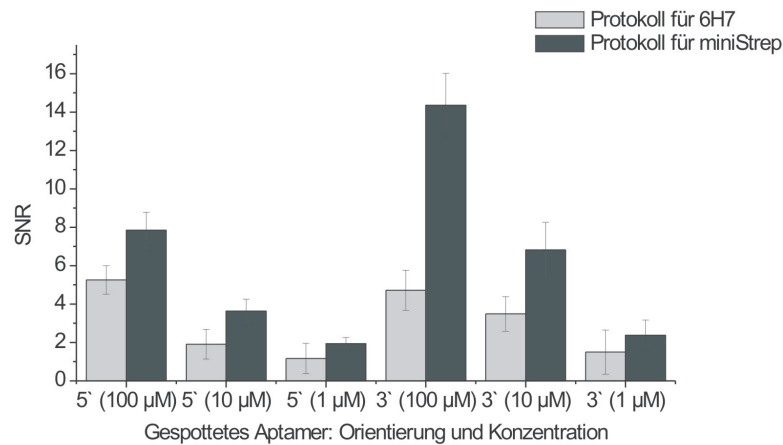


Abbildung 3.28.: *Signal to noise Ratio* (SNR) für das mini-Strep Aptamer in Abhängigkeit vom verwendeten Protokoll.

Die Versuche wurden auf PEI-modifizierten Oberflächen sowohl unter Verwendung des 3' als auch des 5' modifizierten miniStreps durchgeführt, als Target wurde Cy3-markiertes Streptavidin (8 µg/ml) verwendet, die Inkubation mit dem Target wurde für 1 h bei 20°C durchgeführt. Beide Aptamere lieferten Signale, allerdings wurde lediglich eine maximale SNR von 5 erreicht (Abb. 3.28). Um die Signalqualität zu erhöhen, wurde das Protokoll an das miniStrep-Aptamer angepasst. Dabei wurden insbesondere die Denaturierungs- und Faltungsbedingungen berücksichtigt, die während der Selektion des Aptamers benutzt wurden. Hier erfolgte die Denaturierung durch 5 minütiges Erhitzen, im Anschluss wurde das Aptamer für 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Faltung im Selektionspuffer durchgeführt wurde. [9] Durch die Anpassung des Protokolls an das mini-Strep-Aptamer konnte die SNR auf 14 erhöht werden. Dabei zeigte auch das miniStrep Aptamer auf PEI-Oberflächen einen Orientierungseffekt: Das 3' modifizierte Aptamer zeigt höhere Signalintensitäten und höhere SNR-Werte als das 5' modifizierte Aptamer.

Zusätzlich wurden nach dem an das miniStrep-Aptamer angepasste Protokoll Versuche auf GAPS-modifizierten Microarrays durchgeführt. Auf dieser Oberfläche konnte unter den gleichen Versuchsbedingungen lediglich eine maximale SNR von 4 erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich gehört das miniStrep-Aptamer also zu den sterisch eher anspruchsvollen Aptameren, die einen langen *Spacer* benötigen, um ihre aktive Konformation einnehmen zu können.

#### 3.3.2.2.2. Aufnahme einer Bindungs-Kinetik für das miniStrep Aptamer

Während für Genexpressionsarrays die Hybridisierungskinetik zwischen dem immobilisierten Oligonukleotid und der korrespondierenden cDNA aufgrund der Sequenzübereinstimmung (Komplementarität) vorhergesagt werden kann, muss die Kinetik von Aptamer-Protein Bindungen empirisch bestimmt werden. [20] Dazu wurde der zeitliche Verlauf der Bindung zwischen immobilisiertem miniStrep und Cy3-markiertem Streptavidin aufgenommen.

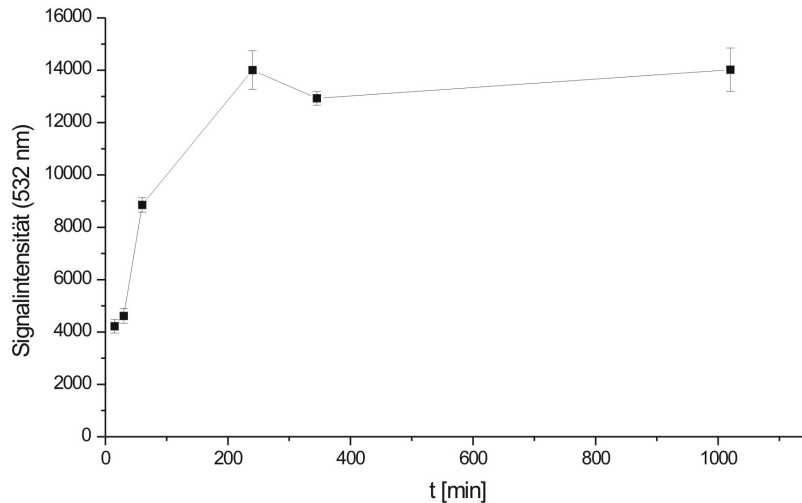


Abbildung 3.29.: Aufnahme einer Kinetik für die Bindung zwischen immobilisiertem mini-Strep und Cy3-markiertem Streptavidin. Dargestellt ist der Verlauf der Signalintensität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

Dazu wurde miniStrep in SBB aktiviert, eine Aktivierung im Tris-basierten Selektionspuffer des miniStrep-Aptamers war nicht möglich, da die Amino-Funktionen des Tris mit dem Cyanurchlorid reagieren würden. Die aktivierten Aptamere wurden in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  mit 10 hits/dot auf PEI-modifizierte Oberflächen gespottet. Es wurden Bindungsstudien mit Cy3-markiertem Streptavidin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Selektionspuffer; 20°C) durchgeführt die Signalintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Target bestimmt. Die Bindung des Targets an das miniStrep scheint nach 4 h abgeschlossen zu sein. Diese Inkubationsdauer wurde für alle folgenden Versuche übernommen.

#### 3.3.2.2.3. Temperaturabhängigkeit des miniStrep Aptamers

In der Literatur wurde für manche Aptamere beschrieben, dass niedrige Temperaturen stabilisierend auf die dreidimensionale Struktur wirken und somit die Bindung des Targets begünstigen. [5] Um die Temperaturabhängigkeit des miniStrep-Aptamers zu bestimmen, wurde die Temperatur während der Inkubation mit Cy3-markiertem Streptavidin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) variiert. Die Inkubation wurde für 4 h durchgeführt.

Aus Abbildung 3.30 ist ersichtlich, dass die SNR mit steigender Temperatur sinkt. In Hinblick auf die Signalqualität ergeben also niedrige Temperaturen das beste Ergebnis. Allerdings weist die Signalintensität bei einer Temperatur von 20°C ein Maximum auf, dabei ist die SNR zwar nicht maximal aber akzeptabel (SNR = 14). Daher wird eine Inkubationstemperatur von 20°C als optimal bestimmt.

#### 3.3.2.2.4. Spezifität der Streptavidin-Bindung

Um auszuschließen, dass es sich bei der Bindung des Streptavidins an das mini-Strep Aptamer um eine unspezifische Bindung eines Proteins an ein Oligonukleotid handelt,

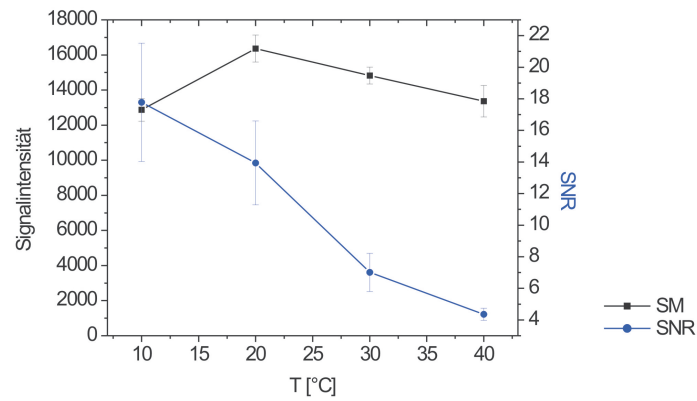


Abbildung 3.30.: Temperaturabhängigkeit der molekularen Erkennung zwischen dem mini-Strep Aptamer und Streptavidin.

wurden die Versuche mit der fehlerhaften Sequenz miniStrep\* wiederholt. Eine Bindung des fluoreszenzmarkierten Streptavidins an das miniStrep\* konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2.3. Aptamer-basierte Detektion von Daunomycin

Aptamere lassen sich nicht nur gegen Proteine sondern auch gegen niedermolekulare Substanzen selektieren. Im Folgenden wird demonstriert, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll nicht nur auf anti-Protein Aptamere, sondern auch auf ein Aptamer, das gegen ein Toxin selektiert wurde, übertragbar ist.

Daunomycin (auch Daunorubicin genannt) ist ein Zytostatikum, welches im Rahmen der Kombinations-Chemotherapie der akuten Leukämien zum Einsatz kommt. Es gehört zu der Zytostatika-Gruppe der Anthrazykline und wird in der Krebstherapie häufig, meist in Kombination mit anderen Wirkstoffen, eingesetzt. Insbesondere durch Krankenhausabwässer wird Daunomycin in die Umwelt eingetragen und stellt daher ein Umwelttoxin dar. Bisherige Nachweismethoden sind aufwändig und Antikörper mit guten Bindungseigenschaften sind nicht erhältlich. Zytostatika sind häufig auch immunsuppressiv und deshalb schlecht für die Generierung von Antikörpern geeignet. Ein Aptamer-basierter Microarray könnte daher wesentlich zur Detektion dieses Toxins beitragen, wobei neben dem Umweltaspekt auch die Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung in Körperflüssigkeiten von Patienten ein potentiell Anwendungsfeld darstellt.

Das anti-Daunomycin Aptamer wurde von Wochner et al. (2008) entwickelt. [169] Bei dem in Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Full Length* Aptamer handelt es sich um ein 80mer mit folgender Sequenz:

anti-Daunomycin: 5' GGG AAT TCG AGC TCG GTA CCA TCT GTG TAA  
GGG GTA AGG GGT GGG GGT GGG TAC GTC TAG CTG CAG GCA  
TGC AAG CTT GG 3'

Das Aptamer weist eine Dissoziationskonstante  $K_d$  von 20 nM auf und wurde in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 20 mM Tris-Cl, 0,05% Tween 20, pH 7,4

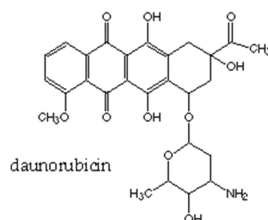


Abbildung 3.31.: Strukturformel von Daunomycin.

selektiert.

Das gegen das Toxin Daunomycin entwickelte Aptamer wurde nach dem für das 6H7-Aptamer entwickelten Protokoll in SBB aktiviert, auf GAPS immobilisiert und nach Umpolung der Oberfläche und Denaturierung in kochendem ddH<sub>2</sub>O in Selektionspuffer gefaltet. Es erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 ng/ml - 100 µg/ml) Daunomycin. Eine Fluoreszenzmarkierung von Daunomycin ist dabei nicht notwendig, da das Anthrazyklin eine Eigenfluoreszenz aufweist. Da Daunomycin dafür bekannt ist, an dsDNA und in geringerem Umfang auch an ssDNA zu binden, wurden das 6H5-Aptamer sowie das miniStrep\* Oligonukleotid als Negativ-Kontrollen verwendet. Das 40 mer 6H5 und das 39 mer miniStrep\* wurden in einer Konzentration von 100 µM gespottet, das anti-Daunorubicin Aptamer (80 mer) in einer Konzentration von 50 µM, um eine vergleichbare Basen-Dichte auf der Microarray-Oberfläche zu erreichen.

Die Ergebnisse des Microarray-Experiments nach Inkubation mit 1 µg/ml Daunomycin sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Zwar sind falsch positive Signale für das 6H5 Aptamer und das miniStrep Oligonukleotid zu erkennen, für diese ergibt sich jedoch - mit Ausnahme des Signals für das 3' miniStrep - eine SNR von unter 3. Das anti-Daunomycin-Aptamer liefert mit Abstand die höchsten Signalintensitäten und SNR-Werte. Die Bindung des Daunomycins an das anti-Daunomycin-Aptamer ist also tatsächlich in der speziellen Sequenz und dreidimensionalen Struktur dieses Aptamers begründet.

Durch direkte Übertragung des entwickelten Protokolls konnte ein Aptamer-Microarray zum Nachweis von Daunorubicin erstellt werden. Mit Hilfe dieses Microarrays konnten Konzentrationen von 1 ng/ml (1,8 nM) nachgewiesen werden. Nach Paul et al. (1980) beträgt die Serumkonzentration nach Daunorubicingabe von 1,5 mg/kg Körpergewicht 2,3 ng/ml bis 18 µg/ml. [122] Somit können mit dem hier entwickelten Microarray pharmakologisch relevante Konzentrationen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass der Aptamer-basierte Microarray auch gegen toxische Substanzen anwendbar ist, gegen die eine Entwicklung von Antikörpern nicht ohne weiteres möglich ist.



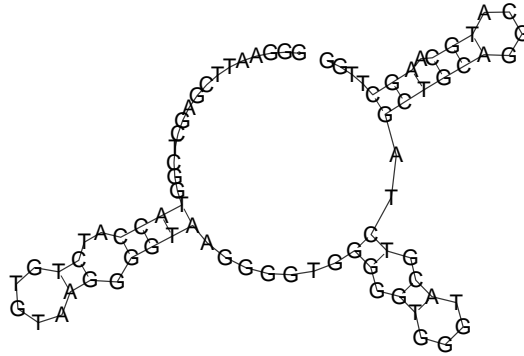
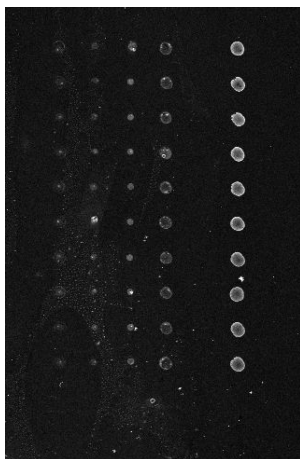
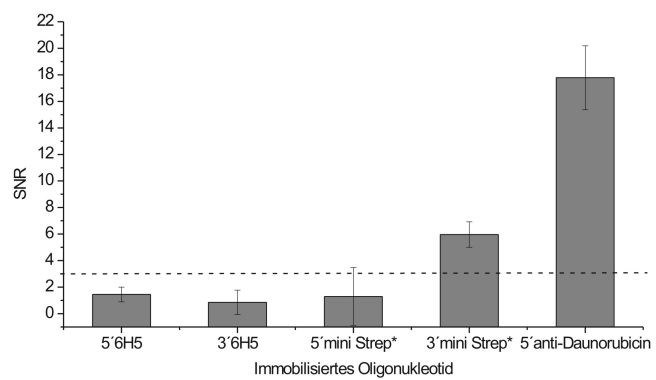


Abbildung 3.32.: Sekundärstruktur des anti-Daunomycin Aptamers. Die Struktur wurde mit RNAfold berechnet. [64]



(a)



(b)

Abbildung 3.33.: Aptamerbasierte Detektion von Daunomycin. (a) Scan. (b) SNR-Analyse.



## 4. Zusammenfassung und Ausblick II

### Zusammenfassung

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Methoden entwickelt die es ermöglichen, Aptamere als Fängermolekül auf Microarrays anzuwenden. Dabei stellte sich die Immobilisierung der Aptamere unter Erhalt ihrer Aktivität als entscheidender Schritt in der Microarray-Entwicklung dar. Für die Funktionalität eines Aptamers ist es notwendig, dass es sich in die definierte dreidimensionale Struktur falten kann, die zur Targeterkennung erforderlich ist. Da Aptamere während der SELEX in Lösung selektiert werden, sind Aptamere zur Ausbildung dieser dreidimensionalen Struktur in Lösung fähig, die korrekte Faltung der Aptamere kann jedoch nach Immobilisierung an einer festen Oberfläche behindert sein. In der vorliegenden Dissertation wurden die folgenden Faktoren die die Faltung eines Aptamers nach Immobilisierung stören können ermittelt:

1. Bei Verwendung besonders reaktiver Oberflächen zur Immobilisierung kann es nicht nur zur Bindung des Aptamers über den terminalen Linker kommen, sondern auch zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen reaktiven Gruppen der Oberfläche und Funktionen innerhalb der Aptamersequenz.
2. Außerdem kann die Faltung eines Aptamers, welches in zu geringem Abstand zur festen Oberfläche immobilisiert wurde, sterisch behindert werden. Hier kann auch die Orientierung des Aptamers eine Rolle spielen.
3. Schließlich können auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Aptamer und Oberfläche eine korrekte Faltung verhindern. Elektrostatische Faktoren spielen vor allem bei Verwendung von positiv geladenen Oberflächen eine Rolle, da die positiven Gruppen der Oberfläche mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrad des Aptamers elektrostatisch wechselwirken können, wodurch sich das Aptamer flach an die Oberfläche anlegt.

Die Faktoren wurden systematisch untersucht und Ansätze zur Lösung der Faltungsproblematik erarbeitet. Die Microarray-Entwicklung fand dabei zunächst unter Verwendung des gegen den His-Tag gerichteten Aptamers 6H7 statt.

1. Um die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Funktionen innerhalb der Aptamersequenz und reaktiven Gruppen auf der Microarray-Oberfläche zu vermeiden, wurden Amino-modifizierte Microarray-Substrate verwendet. Um terminal Amino-modifizierte Aptamere auf diesen Oberflächen immobilisieren zu können, wurden die Aptamere mit Cyanurchlorid aktiviert. Die Verwendung von terminal aktivierten Aptameren auf eher unreaktiven Amino-Oberflächen ermöglicht die gerichtete Immobilisierung über den terminalen Linker unter Ausschluss von weiteren kovalenten

Bindungen zwischen Aptamer und Substrat. Es konnte gezeigt werden, dass das gegen den His-Tag gerichtete Aptamer 6H7 nach Aktivierung mit Cyanurchlorid auf Amino-modifizierten Microarrays auch nach Immobilisierung seine Funktion beibehält (siehe Abb. 3.15 auf Seite 125). Dabei wurde für dieses Aptamer ein ausgeprägter Orientierungseffekt festgestellt: während das über sein 3' Ende immobilisierte Aptamer funktional war, wies das über das 3' Ende immobilisierte Aptamer keine Aktivität auf.

2. Um sterische Hinderung zwischen Aptamer und Oberfläche zu minimieren, wurde PEI als großer zusätzlicher *Spacer* verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass PEI nicht nur als *Spacer* dient, sondern auch zu einer Erhöhung der Bindungskapazität der Oberfläche führt (vgl. Abb. 3.14 auf Seite 124).
3. Um elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem negativen Phosphatrückgrad des Aptamers und den positiv geladenen Amino-modifizierten Microarray-Oberflächen zu vermeiden, wurden die Microarray-Oberflächen mit Bernsteinsäureanhydrid umgepolt. Diese Behandlung führte zu einer Erhöhung der Signalintensitäten nach Bindungsexperimenten mit dem korrespondierenden Target-Protein und zu einer Abnahme des Hintergrundes. So konnten nach erfolgter Umpolung auf GAPS-modifizierten Oberflächen exzellente Signalqualitäten (SNR=186, vgl. Abb. 3.18 auf Seite 127) erreicht werden. Auf PEI-Oberflächen wurden keine so hohen SNR-Werte erreicht, allerdings wurden hier für das 6H7-Aptamer keine Orientierungseffekte beobachtet. Offensichtlich trug der voluminöse *Spacer* dazu bei, dass sich das 6H7-Aptamer unabhängig von seiner Orientierung korrekt falten konnte.

Für die Anwendung des 6H7-Aptamers auf Microarrays wurde ein Protokoll entwickelt und optimiert (siehe Abschnitt 3.3 auf Seite 131). Die universelle Anwendbarkeit der entwickelten Immobilisierungs-Strategie konnte durch Übertragung auf weitere Aptamere demonstriert werden.

- Dazu wurde zunächst das ebenfalls gegen den His-Tag gerichtete Aptamer 6H5, welches der selben Selektion entspringt wie das 6H7-Aptamer, verwendet. Das Protokoll konnte in diesem Fall direkt übernommen werden (siehe Abschnitt 3.3.2.1 auf Seite 136).
- Darüber hinaus wurde das Protokoll auf Aptamere übertragen, die unter anderen Bedingungen selektiert wurden. Dabei waren für das anti-Daunorubicin-Aptamer lediglich geringfügige Modifikationen nötig. So wurde dieses Aptamer in Tris-haltigem Puffer selektiert. Dieser Puffer kann während der Aktivierung mit Cyanurchlorid nicht verwendet werden und wurde durch SBB ersetzt. Alle anderen Schritte der Aktivierung und Immobilisierung konnten ebenso wie das Protokoll zur Prozessierung der Microarrays direkt vom 6H7-Aptamer übernommen werden (Abschnitt 3.3.2.3 auf Seite 141).
- Bei Verwendung des gegen Streptavidin gerichteten miniStrep Aptamers musste zusätzlich eine Anpassung der Denaturierungs/Faltungsbedingungen an die während der SELEX verwendeten Bedingungen vorgenommen werden (Abschnitt 3.3.2.2).

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Immobilisierung von Aptameren unter Erhalt ihrer Aktivität entwickelt werden. Die Immobilisierungsstrategie scheint für Aptamere universell einsetzbar zu sein. Je nach Selektionsbedingung des verwendeten Aptamers sind jedoch Modifikationen des Protokolls notwendig.

Darüber hinaus wurden zwei Oberflächen zur Herstellung von aptamerbasierten-Microarrays bereitgestellt.

- Auf GAPS-modifizierten Oberflächen konnten dabei exzellente Signalqualitäten erreicht werden. Allerdings zeigte das 6H7-Aptamer auf dieser Oberfläche nur Aktivität, wenn es über einen 5´terminalen Linker immobilisiert wurde. Auch das miniStrep-Aptamer zeigte auf der GAPS-Oberfläche nur schwache Signale (SNR=4).
- Mit der PEI-Oberfläche konnte ein universell einsetzbares Microarray-Substrat bereitgestellt werden, auf dem alle verwendeten Aptamere Aktivität aufwiesen. Für das anti-Daunomycin-Aptamer konnten auf dieser Oberfläche Konzentrationen von 1,8 nM nachgewiesen werden. Somit eignet sich der hier entwickelte Microarray auch zur Detektion von pharmakologisch relevanten Konzentrationen des Toxins.

Die größere Stabilität von immobilisierten Aptameren im Vergleich zu Antikörpern konnte bestätigt werden. Innerhalb eines Zeitraumes von 16 Tagen konnte kein Verlust der Aktivität des 6H7-Aptamers nach Immobilisierung auf der Microarray-Oberfläche beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.23 auf Seite 134). Für Antikörper konnte innerhalb des gleichen Zeitraums hingegen eine deutliche Abnahme der Aktivität festgestellt werden (siehe Tabelle 3.5 auf Seite 54).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Immobilisierungsstrategie nicht auf das Microarray-Format beschränkt ist. Die Methode zur Aktivierung und Immobilisierung wurde auf *Magnetic Beads* übertragen und zur Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* Lysaten angewendet. Der dabei erreichte Aufreinigungseffekt demonstriert die Spezifität der immobilisierten Aptamere (siehe Abb. 3.24 auf Seite 136).

## Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten konnten Microarrays zur Detektion von His-getagten Proteinen, Streptavidin und Daunomycin etabliert werden. Ein großer Vorteil des Microarray-Formats ist die Möglichkeit des *Multiplexing*, d. h. der parallelen Detektion mehrerer Analyten in einer einzigen Probe. Da die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere nicht unter gleichen Bedingungen selektiert wurden, war ein *Multiplexing* im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich. Die verwendeten Aptamere benötigen unterschiedliche Puffer zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation, darüber hinaus war für das miniStrep Aptamer auch eine Anpassung der Denaturierungs/Faltungs-Bedingungen notwendig.

Um das volle Potential von Aptameren in der Microarray-Technologie nutzbar zu machen, sollten alle Aptamere, die auf einem Microarray verwendet werden sollen, unter den gleichen Bedingungen selektiert werden. Dabei ist vor allem der während der SELEX verwendete Puffer entscheidend. Dieser Puffer sollte nach Möglichkeit keine Amino-Funktionen

enthalten, um mit der hier verwendeten Methode zur Aktivierung von Aptameren mit Cyanurchlorid kompatibel zu sein. Zwar kann auch SBB als universeller Aktivierungspuffer verwendet werden, allerdings zeigte das 6H7-Aptamer nach Aktivierung in seinem Selektionspuffer bessere Target-Bindungs-Eigenschaften als nach Aktivierung in SBB (siehe Abb. 3.20 auf Seite 129).

Für den Entwickler von Microarrays wäre es darüber hinaus sinnvoll, die Selektionen selbst durchzuführen. Somit kann die SELEX unter den Bedingungen durchgeführt werden, unter denen die Aptamere auf dem Microarray angewendet werden sollen. In der Literatur veröffentlichte Aptamere wurden häufig unter sehr unterschiedlichen Bedingungen selektiert. Darüber hinaus werden Aptamere häufig in Lösung angewendet und müssen nach Immobilisierung auf einer Oberfläche nicht aktiv sein. Aus einer SELEX gehen stets mehrere Aptamer-Kandidaten hervor. In der Literatur werden häufig nur die Sequenzen mit der höchsten Affinität veröffentlicht, wobei die Affinitäten meist in Lösung ermittelt werden. Zur Entwicklung von Microarrays wäre es sinnvoll, alle Aptamer-Kandidaten, die einer SELEX entspringen, auf einem Microarray zu testen und ausgehend von den Ergebnissen dasjenige Aptamer auszuwählen, das nach Immobilisierung auf der Oberfläche die besten Eigenschaften zeigt. In diesem Zusammenhang könnten die hier entwickelten Methoden und Substrate als Grundlage für einen *Screening*-Assay genutzt werden.

Zur Erhöhung der Sensitivität der entwickelten Microarrays wäre darüber hinaus wünschenswert, auch Detektions-Aptamere, die den Komplex aus Aptamer und Target erkennen, zu selektieren. Ein Sandwich-Assay macht das Labeling der zu detektierenden Proteine überflüssig. Das Labeling der Target-Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen konnte zwar im Rahmen vorliegender Arbeit erfolgreich optimiert und eingesetzt werden, allerdings stellt das Labeling komplexer Proben, in denen das Target häufig nur als minore Komponente vorkommt, eine größere Herausforderung dar, da nicht alle Proteine mit gleicher Effizienz markiert werden und die Zusammensetzung der Probe durch das Labeling verändert werden könnte. Hier könnten fluoreszenzmarkierte Detektions-Aptamere die den Aptamer-Target-Komplex erkennen Abhilfe schaffen. Außerdem ist aus der Protein-Microarray-Technologie bekannt, dass die indirekte Detektion unter Verwendung von sekundären Antikörpern im Vergleich zur direkten Detektion zu niedrigeren Detektionslimits führt. Diese hohe Sensitivität von Sandwich Assays konnte auch in Teil I dieser Arbeit bestätigt werden.

# Anhang





# A. Materialien

## A.1. Verwendete Puffer

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von Reinstwasser (Arium 611 uv, Sartorius, Göttingen) hergestellt. Alle Lösungen, die zur Proteinaufreinigung verwendet wurden, wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert und entgast. Mit den Puffern für die SPR-Messungen wurde ebenso verfahren. Puffer, die im Zusammenhang mit Microarrays verwendet wurden, wurden sterilfiltriert.

anti-Daunomycin Selektionspuffer: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-Cl, 0,05% Tween 20, pH 7,4

LB-Medium: 10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

miniStrep Selektionspuffer: 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-Cl, pH8,0

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, auf pH 7,5 einstellen.

PBS-6H7: 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,5

PBST-6H7: 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5

SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, auf pH 7 einstellen.

TAE: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig, pH 8,5

TSS: LB-Medium, 10% PEG, 5% DMSO, 30 mM Magnesiumchlorid

## A.2. Chemikalien

Acetonitril (Fluka, Buchs, CH)

Agarose (Fluka, Buchs, CH)

Borsäure (Sigma, Buchs, CH)

Bacto-Trypton (Roth, Karlsruhe)

BSA (Sigma, Buchs, CH)

Cobaltsulfat (Merck, Darmstadt)

Cyanurchlorid (Sigma, Buchs, CH)

D(+)-Trehalose (Fluka, Buchs, CH)

## A. *Materialien*

Daunorubicin (Sigma, Buchs, CH)  
Dikaliumhydrogenphosphat  $K_2HPO_4$  (Sigma, Buchs, CH)  
EDC (Fluka, Buchs, CH)  
EDTA (Na-Salz) (Fluka, Buchs, CH)  
Ethanol (Merck, Darmstadt)  
Ethanolamin (Sigma, Buchs, CH)  
Formaldehydlösung (36,5 %) (Fluka, Buchs, CH)  
Glycerin (Fluka, Buchs, CH)  
Glycin (Sigma, Buchs, CH)  
HCl (30%) (Fluka, Buchs, CH)  
Hefeextrakt (Fluka, Buchs, CH)  
Imidazol (Merck, Darmstadt)  
IPTG (AppliChem, Darmstadt)  
Kaliumchlorid (Fluka, Buchs, CH)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Kupfersulfat (Merck, Darmstadt)  
11-Mercaptoundecanonon Acid (Aldrich, Buchs, CH)  
 $MgCl_2$  (Riedel de Haën, Seelze)  
Natriumacetat (Riedel de Haën, Seelze)  
Natriumchlorid (Fluka, Buchs, CH)  
Natriumcitrat (Sigma, Buchs, CH)  
 $NaHCO_3$  (Merck, Darmstadt)  
NHS (Fluka, Buchs, CH)  
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Merck, Darmstadt)  
Natronlauge (Riedel de Haën, Seelze)  
 $NiSO_4$  (Fluka, Buchs, CH)  
PEI (Sigma, Buchs, CH)  
Rhamnose (Sigma, Buchs, CH)  
Salzsäure (Riedel de Haën, Seelze)  
Schwefelsäure (Fluka, Buchs, CH)  
SDS (Sigma, Buchs, CH)  
Sybr Green II (Amresco, Solon, OH, USA)  
TopBlock (Fluka, Buchs, CH)  
Tris-Base (Fluka, Buchs, CH)  
Tween 20 (Sigma, Buchs, CH)  
 $ZnSO_4$  (Merck, Darmstadt)

### A.3. Biomoleküle und Kits

Alexa Fluor<sup>®</sup>555 goat anti mouse IgG (Invitrogen, Karlsruhe)  
 Alexa Fluor<sup>®</sup>555 Penta His (Invitrogen, Karlsruhe)  
 Alexa Fluor<sup>®</sup>647 Penta His (Invitrogen, Karlsruhe)  
 anti Collagen I, monoklonal, goat anti human (dianova, Hamburg)  
 anti Collagen I, polyklonal, biotinyliert, goat anti human (dianova, Hamburg)  
 anti His Tag (Acris, Hiddenhausen)  
 anti Osteopontin, monoklonal, mouse anti human (R&D Systems, Wiesbaden)  
 anti Osteopontin, polyklonal, biotinyliert, mouse anti human (R&D Systems, Wiesbaden)  
 Aptamere (miniStrep, anti-Daunorubicin) Synthese durch Purimex (Grebenstein)  
 Aptamere (6H5 und 6H7) Synthese durch Operon (Köln)  
 BD Clontech Protein Extraction & Labeling Kit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)  
 Collagen I human (VWR International GmbH, Darmstadt)  
 Cy<sup>TM</sup>3-conjugated Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK)  
 Cy<sup>TM</sup>5-conjugated Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK)  
 goat anti Streptavidin (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)  
 mouse IgG ELISA (Roche Applied Sciences)  
 Osteopontin, human (R&D Systems, Wiesbaden)

### A.4. Microarray-Substrate

FAST<sup>TM</sup> Slide (Whatman, Dassel)  
 GAPS<sup>TM</sup> Coated Slides (Corning, Acton, MA, USA)  
 Path<sup>TM</sup> Slide (GenTel Biosciences, Madison, WI, USA)  
 Schott Nexterion<sup>®</sup>A (Schott Nexterion, Louisville, KY, USA)  
 Schott Nexterion<sup>®</sup>Al (Schott Nexterion, Louisville, KY, USA)  
 Schott Nexterion<sup>®</sup>H (Schott Nexterion, Louisville, KY, USA)  
 UltraGAPS<sup>TM</sup> Coated Slides (Corning, Acton, MA, USA)  
 VSS-25 Silylated Slides (CEL Associates, Inc., Pearland, Texas, USA)

### A.5. Verbrauchsmaterialien

Adhesive Seal-Tab (Invitrogen, Karlsruhe)  
 HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, München)

## A. *Materialien*

Medizinisches Tape arcare (adhesive research, Glen Rock, PA, USA)

Microcon-3 (Millipore GmbH, Schwalbach)

Objektträger Super-Frost (Menzel-Gläser, Braunschweig)

ProPlate Slide Module (Grace Biolabs, Bend, OR, USA)

Protein Desalting Spin Columns (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)

Sartobind IDA 75 (Sarorius Stedim Biotech, Göttingen)

Secure Seal Hybridisation Chamber (Grace Biolabs, Bend, OR, USA)

Schmelzklebefolie Miravithen D24 (Leuna Polymer, Leuna)

Uhu Kontakt Kraftkleber Gel (UHU GmbH&Co.KG, Bühl)

Vivaflow Konzentratoren (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren 3 kDa MWCO (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Vivawell 8-Strips (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

## A.6. **Verwendete Geräte**

Arrayer (kontakt): Affymetrix 417<sup>TM</sup> Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Arrayer (kontaktfrei): sciFLEXARRAYER S3 (scienion AG, Berlin)

Autoklav: Systec V-150 (Systec GmbH, Wettenberg)

Bioanalyzer: 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Brutschrank: CertomatR HK (B. Braun Biotech International, Melsungen)

FPLC: BioLogic AVR7-3 (BIO-RAD, München)

Fraktionssammler: Model 2128 (BIO-RAD, München)

Hybridisierungs-ofen: Thermo Hybaid Shake'n'Stack (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Nanodrop: Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc; Wilmington, DE, USA)

Reinstwasseranlage: Arium 611 uf uv (Sartorius, Göttingen)

pH-Meter: HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)

Power-Supply (Gelelektrophorese): Electrophoresis Power Supply - EPS 301 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

Scanner: GenePix<sup>®</sup>4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)

Slideaufsatz für Thermomixer: Eppendorf slides (Eppendorf, Hamburg)

SPR: Autolab ESPRIT (EcoChemie, Utrecht, Niederlande)

Thermocycler: Px2 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

Titrationsskalorimeter: VP-ITC (MicroCal, Northampton, USA)

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super RK 510 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin)

Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße: Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge für Falkontubes und Mikrotiterplatten: Megafuge 1.0 RS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode)

## **A.7. Verwendete Software**

Arrayer: GMS 417 Arrayer Version 1.5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Scanner: GenePix<sup>®</sup>Pro 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)

Auswertung von Microarrays: ImaGene<sup>™</sup> 5.5.3 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA)

Auswertung (SPR und ITC): Origin 5.0 und 6.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA)



# Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ADONMA	<i>Analyte Dependent Oligonucleotide Modulation Assay</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bgl	β-Glucanase
BM	<i>Background Mean</i>
BrdU	5-Bromo-Deoxyuridine
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSE	<i>Bacillus subtilis</i> Esterase
BSTE	<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase
C	Kohlenstoff
cDNA	copy DNA
Cy3	Indocarbocyanine
Cy5	Indodicarbocyanine
D/P	<i>Dye to Protein Ratio</i>
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	<i>Desoxyribonuceic Acid</i>
dsDNA	<i>double stranded</i> DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	Diethylaminopropyl-N-Ethylcarbodiimid
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELAA	<i>Enzyme Linked Aptamer Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELONA	<i>Enzyme Linked Oligonucleotide Assay</i>
ET	<i>Electronic Tongue</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Flavin Mononukleotid
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
GAPS	Gamma Aminopropylsilan
His	Histidin

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IDA	<i>Imminodiacetic Acid</i>
IgE	Immuno Globulin E
IgG	Imunoglobulin G
IMAC	<i>Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
LB	Luria-Bertani
LOD	<i>Limit of Detection</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NC	Nitrocellulose
NHS	N-Hydroxy Succinimide
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NRR	Nichthomologe-Random-Rekombination
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
OD	Optische Dichte
ODN	<i>Oligodeoxy Nucleotid</i>
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST-6H7	Selektionspuffer des 6H7 Aptamers
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PenG	Penicillin G Amidase
PFEI	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i>
pNBE	<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur



SAH	S-Adenosylhomocystein
SAW	<i>Surface Acoustic Wave</i>
SBB	<i>Sodiumborate Buffer</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SM	<i>Signal Mean</i>
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SPRI	<i>Surface Plasmon Resonance Imaging</i>
SSC	<i>Sodium Chloride and Sodium Citrate Solution</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
Stdev. BG	<i>Standarddeviation of Background</i>
TAE	Tris-Acetat-Sodiumdodecyl-Puffer
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Unterschiedliche Strategien zur Detektion von Proteinen im Microarray-Format. Quelle: MacBeath (2002). [98] . . . . .	12
2.1. Falschfarbendarstellung des Verlaufs der Signalintensität beim 428 Array Scanner (Affymetrix). Quelle: www.affymetrix.com. . . . .	19
2.2. Einfluss des in ImaGene <sup>TM</sup> gewählten maximalen Spot-Durchmessers auf die SNR. . . . .	20
2.3. Magnetrahmen aus Metallplatte und Magnetfolie. Quelle: Inka Praulich . . . . .	21
2.4. Die mittlerweile über SCHOTT erhältlichen Schott Nexterion <sup>®</sup> Slides NC-W und NC-D. Quelle: www.schott.com/nexterion. . . . .	23
2.5. Die Nexterion <sup>®</sup> Slides NC sind im single-Pad und 16-Pad Format erhältlich. Quelle: www.schott.com/nexterion. . . . .	23
2.6. Beurteilung der Aufreinigung mittels SDS-PAGE. Aufgetragen wurden folgende Fraktionen: (M) Molekulargewichtsmarker, (1) Zellkulturüberstand, (2) und (3) Durchlaufaktionen, (4) Waschfraktion, (5)-(7) Elutionsfraktionen. Quelle: Claas Haake. . . . .	32
2.7. 16-Pad Slide und ProPlate Slide Module sowie die Apparatur zur Fixierung der Hybridisierungskammer. . . . .	33
3.1. Abhängigkeit der SNR vom PMT-Gain. . . . .	36
3.2. Erhöhung des Hintergrundes der Membran durch Verwendung von medizinischen Tapes zur Befestigung der Membran auf dem Glas-Träger. . . . .	37
3.3. Einfluss der Porengröße auf die Signalintensität im Microarray-Experiment. . . . .	38
3.4. Direkt beschichtete Microarray-Substrate. Links: schwarze Membran. Mitte: weiße Membran. Rechts: 16-Pad Slide. . . . .	40
3.5. SNR-Analyse für die schwarze Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar. . . . .	41
3.6. Oberflächenscans der untersuchten Microarray-Substrate vor (links) und nach dem Microarray-Experiment. . . . .	43
3.7. Analyse der relativen Signalintensität und der SNR für unterschiedliche Substrate in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Proteins. . . . .	44
3.8. SNR-Analyse für die weiße Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar. . . . .	45

3.9. SNR-Analyse für die weiße Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Antikörpers. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar. . . . .	46
3.10. REM-Aufnahme eines Spots, der mit dem Kontaktdrucker (Pin und Ring) gedruckt wurde. Quelle: Markus Hollas, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.	46
3.11. Spottingschema (A) und Scans (B) der unterschiedlichen Microarray-Substrate die mit dem Kontaktdrucker gespottet wurden. Bei Verwendung von PBS + 0,5% SDS als Spottingpuffer lag bei der Konzentration F (31,25 µg/ml) vermutlich ein Pipettierfehler vor. Diese Konzentration wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. . . . .	50
3.12. Scans der unterschiedlichen Microarray-Substrate die mit dem kontaktfreien Drucker gespottet wurden. Das Spottingmuster entspricht dem in Abbildung 3.11 beschriebenen. . . . .	51
3.13. Anwendung des Forward Phase Microarrays zur Beurteilung der Labeling-Güte von Cy3-markiertem Bgl-His. . . . .	54
3.14. Scans für das Zweifarbenexperiment. Dargestellt sind die Scans für die einzelnen Wellenlängen sowie ein mit GenePix Pro 6 erstelltes Overlay der beiden Bilder. . . . .	55
3.15. Analyse der Aufreinigung von Bste-his aus <i>E. coli</i> -Lysaten. (A) Scan und Spottingschema. (B) Signalintensität in Abhängigkeit von der aufgetragenen Probe. . . . .	58
3.16. Bgl-His Standardreihe auf dem Protein-Microarray. (A) Scan und Spottingschema. (B) Polynomische Regression. . . . .	59
3.17. Experimenteller Aufbau und Scan des Microarrays zur Quantifizierung eines Antikörpers in Zellkulturüberständen. . . . .	60
3.18. Verlauf der mittels Microarray bestimmten Konzentrationen gegen die Kultivierungsdauer sowie der Vergleich der mittels Microarray und ELISA bestimmten Konzentrationen. . . . .	60
3.19. Aufbau des Sandwich zur Detektion des gegen Penicillin G Amidase (PenG) gerichteten Antikörpers sowie Versuchsaufbau zur Quantifizierung im 16-Pad Format. . . . .	62
3.20. Analyse der Signalintensität und der SNR in Abhängigkeit von der Konzentration des Target-Proteins im Sandwich Format bestimmt unter Verwendung eines 16-Pad-Slides. . . . .	63
3.21. Schematischer Aufbau des Sandwich-Assays zur Detektion von Osteopontin.	66
3.22. SNR-Analyse der Microarrays zur Detektion von Osteopontin und Collagen I im Sandwich-Format. Aufgetragen wurden jeweils reines Protein sowie Zellkulturüberstände. Außerdem wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Dabei wurde auf die Inkubation mit dem Target verzichtet, um eine eventuell stattfindende Bindung des Detektionsantikörpers oder des Streptavidins an den immobilisierten Antikörper feststellen zu können. . . . .	66

1.1.	Die SELEX als iterativer Prozess aus Selektion und Amplifikation. Dargestellt ist die Inkubation zwischen Oligonukleotidbibliothek und dem immobilisierten Target (i). Während der Inkubation bindet ein geringer Anteil der Oligonukleotidsequenzen an das Target, nicht bindende Sequenzen werden durch Waschen entfernt (ii). Die bindenden Sequenzen werden eluiert (iii) und dienen nach Amplifikation (iv) als verkleinerte Bibliothek für einen neuen SELEX-Zyklus. Quelle: Proske et al. (2005). [129] . . . . .	72
1.2.	Üblicherweise enthalten die in der SELEX eingesetzten Oligonukleotide eine 40 Basen umfassende Random-Region. Unter Berücksichtigung der Primer ergeben sich <i>Full Length</i> Aptamere von 80-90 nt. Eine Verkürzung um die Anteile, die zur Bindung des Targets nicht notwendig sind, führt zu Aptameren, die ca. 40 Nukleotide lang sind. Es wurden jedoch auch schon kürzere Aptamere publiziert. . . . .	72
1.3.	Antikörper und Aptamere im Größenvergleich. Quelle: www.NascaCell.de. . . . .	77
1.4.	Funktionsprinzip eines <i>Aptamer Beacons</i> . In Abwesenheit des Targets (rote Elipse) befinden sich Fluorophor (Stern) und <i>Quencher</i> (grünes Quadrat) in unmittelbarer Nähe zueinander. Durch die Bindung des Targets wird der Stamm geöffnet, Fluorophor und <i>Quencher</i> entfernen sich voneinander, es wird ein Fluoreszenz-Signal emittiert. . . . .	78
1.5.	Das Cyanocobalamin Aptamer. (a) Stränge, die die Triplex formen sind in dunkelblau, cyan und gelb dargestellt, die Stränge die die Duplex ausbilden grün und magenta. Cyanocobalamin ist in rot dargestellt. (b) Detaillierte Darstellung der Basen-Triplets. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den drei Basen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Quelle: Sussman et al.(2000). [155] . . . . .	79
1.6.	Struktur des anti-Thrombin Aptamers ( <i>Thrombin Binding Aptamer</i> , TBA). (a) Anordnung der Quartetts zueinander. (b) Detaillierte Darstellung der Bindungen innerhalb eines G-Quartetts. Quelle: Macaya et al. (1993). [97] . . . . .	80
2.1.	Anordnung der 8-Strips auf Mikrotiterplatten sowie Beladung der Membranen mit unterschiedlichen Metallionen. . . . .	94
3.1.	(a) Nachweis der Expression der His-getagten Esterasen mittels SDS-PAGE. (1) BSTE-His; (2) BSE-His; (3) pNBE-His; (4) PFEI-His. (b) Aufreinigung von pNBE: (M) Molekulargewichtsstandard, (1) <i>E. coli</i> Lysat, (2) aufgereinigtes pNBE. . . . .	111
3.2.	(a) Einfluss des Verhältnisses zwischen Protein und Farbstoff während des Labeling von Bgl-His mit Cy3 NHS-Ester auf die Labelingeffizienz. Farbstoffkonzentrationen im Vergleich zu der vom Hersteller empfohlenen Konzentration: A: 0,5-fach, B: 1-fach, C: 2-fach, D: 5-fach. (b) Signalintensität und SNR im Antikörper-basierten Microarray-Experiment in Abhängigkeit von der erzielten D/P. . . . .	112
3.3.	Dot-Blot der Wahrscheinlichkeit von Basenpaaren in den Sequenzen von 6H7 (oben) und 6H5 (unten) sowie die wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen der beiden Aptamere. . . . .	114

3.4. Rohdaten und Ergebnisse der ITC Messungen. . . . .	115
3.5. SPR-Senseogramme für 6H5 und 6H7. Aufgetragen ist der Verlauf des gegen eine Referenzzelle aufgenommene Signals gegen die Zeit. . . . .	117
3.6. SPR-Senseogramm für den Antikörper. Die Messung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Messungen mit den Aptamern 6H5 und 6H7. . . . .	118
3.7. Mittels SPR bestimmte Bindungsisothermen der gegen den His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 sowie eines gegen den His-Tag gerichteten Antikörpers gegenüber dem His-getaggten Protein PFEI. . . . .	118
3.8. Darstellung der verschiedenen Entwicklungsstufen eines Aptamer-basierten Microarrays. . . . .	119
3.9. Versuch zur Entwicklung eines Aptamer-basierten Microarrays auf Aldehyd-modifizierten Substraten. Die Immobilisierung des Aptamers konnte mittels Sybr Green II nachgewiesen werden, eine Bindung des Target-Proteins konnte nicht beobachtet werden. Gespottet wurden jeweils 500 pl Aptamerlösung der folgenden Konzentrationen: (A) 100 $\mu$ M, (B) 10 $\mu$ M, (C) 1 $\mu$ M. . . . .	120
3.10. Darstellung der unterschiedlichen Faktoren, die die korrekte Faltung des Aptamers behindern können. . . . .	121
3.11. Aktivierung eines Aptamers (ODN, <i>Oligodeoxy Nucleotid</i> ) mit Cyanurchlorid. . . . .	122
3.12. Kopplung des aktivierten Aptamers an Amino-funktionalisierte Oberflächen. . . . .	123
3.13. Beschichtung von Aldehyd-modifizierten Oberflächen mit PEI. . . . .	124
3.14. Nachweis der Immobilisierung des aktivierten 6H7-Aptamers auf GAPS und PEI mit Sybr Green II. Von links nach rechts wurden folgende Aptamere und Konzentrationen gespottet: 1) 3'6H7, 100 $\mu$ M; 2) 3'6H7, 10 $\mu$ M; 3) 3'6H7, 1 $\mu$ M; 4) 5'6H7, 100 $\mu$ M; 5) 5'6H7, 10 $\mu$ M; 6) 5'6H7, 1 $\mu$ M. Beide Scans wurden bei gleicher Laserstärke und gleichem Gain aufgenommen. . . . .	124
3.15. Nachweis der Bindung des Cy3-markierten Targetproteins. Das Spottingmuster entspricht dem in Abb. 3.14 beschriebenen. Der GAPS Slide wurde bei Gain 650 gescannt, der PEI Slide bei Gain 500. . . . .	125
3.16. Umpolung der GAPS- und PEI-Oberflächen mit Bernsteinsäureanhydrid. . . . .	126
3.17. Bindungsstudien von Cy3-markiertem Bgl-His an GAPS- und PEI-Oberflächen. Gespottet wurde aktiviertes 6H7-Aptamer in dem selben Spottingmuster wie in Abbildung 3.14 beschrieben. Vor der Inkubation mit dem Target-Protein wurde die Oberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid umpolt. Beide Scans wurden bei gleichen Lasereinstellungen und bei dem gleichen Gain erstellt. . . . .	126
3.18. SNR-Analyse für aktiviertes 6H7 auf GAPS (dunkelgrau) und PEI (hellgrau) nach Umpolung der Oberfläche. . . . .	127
3.19. Immobilisierungseffizienz (a) und Effizienz der Targetbindung (b) in Abhängigkeit von den Aktivierungsbedingungen und der Konzentration des Aptamers beim Spotten. Variiert wurde das molare Verhältnis zwischen Aptamer und Cyanurchlorid während der Aktivierung. . . . .	128

3.20. Immobilisierungseffizienz (a) und Effizienz der Targetbindung (b) in Abhängigkeit von dem zur Aktivierung des Aptamers und zum Spotten verwendeten Puffer. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Hitzebehandlung der Slides zum Denaturieren und Falten des Aptamers notwendig ist, um eine Bindung des Targets zu ermöglichen. . . . .	129
3.21. Demonstration des dynamischen Bereichs des entwickelten Microarrays: Signalintensität in Abhängigkeit von der PFEI-His Konzentration. . . . .	133
3.22. Bestimmung der Nachweisgrenze für PFEI-His auf GAPS- und PEI-modifizierten Microarrays. Die gestrichelte Linie stellt das Detektionslimit (SNR=3) dar. . . . .	134
3.23. Test der Stabilität des immobilisierten 6H7 im Verlauf von 16 Tagen nach der Immobilisierung. . . . .	134
3.24. SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung von His-getaggtten Proteinen aus <i>E. coli</i> Lysaten über das 6H7-Aptamer. 1: Molekulargewichtsstandard, 2: PFEI-haltiges Lysat, 3: Waschfraktion, 4: 1. Elution, 5: 2. Elution, 6: pNBE-haltiges Lysat, 7: Waschfraktion, 8: 1. Elution, 9: 2. Elution. . . . .	136
3.25. Verlauf der Signalintensität für das 6H5 und das 6H7 Aptamer nach Target-Bindungsstudie mit Cy3-markiertem Bgl-His in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Aptamers. . . . .	137
3.26. Verlauf der Signalintensität für das 6H5 und das 6H7 Aptamer nach Target-Bindungsstudie mit Cy3-markiertem PFEI-His in Abhängigkeit von der Konzentration des gespotteten Aptamers. . . . .	137
3.27. Sekundärstruktur des miniStrep Aptamers (a) und der fehlerhaften Sequenz miniStrep* (b). Die Strukturen wurden mit RNAfold berechnet. [64] . . . . .	138
3.28. <i>Signal to noise Ratio</i> (SNR) für das mini-Strep Aptamer in Abhängigkeit vom verwendeten Protokoll. . . . .	139
3.29. Aufnahme einer Kinetik für die Bindung zwischen immobilisiertem mini-Strep und Cy3-markiertem Streptavidin. Dargestellt ist der Verlauf der Signalintensität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. . . . .	140
3.30. Temperaturabhängigkeit der molekularen Erkennung zwischen dem mini-Strep Aptamer und Streptavidin. . . . .	141
3.31. Strukturformel von Daunomycin. . . . .	142
3.32. Sekundärstruktur des anti-Daunomycin Aptamers. Die Struktur wurde mit RNAfold berechnet. [64] . . . . .	143
3.33. Aptamerbasierte Detektion von Daunomycin. (a) Scan. (b) SNR-Analyse. . . . .	143





# Tabellenverzeichnis

1.1. Vergleich verschiedener möglicher Fänger-moleküle für Protein-Microarrays nach Phelan und Nock 2003. [125] . . . . .	11
1.2. Möglichkeiten zur Bindung von Antikörpern an Oberflächen. . . . .	15
2.1. Zur Bestimmung des Einflusses der Porengröße verwendete Membranen. . . . .	22
2.2. Als Vergleichs-Systeme verwendete Microarray-Substrate. . . . .	25
3.1. Vergleich der schwarzen und weißen Membranen: Eigenfluoreszenzen sowie Signalintensitäten und SNR-Werte im Microarray-Experiment. . . . .	39
3.2. Vergleich der Eigenfluoreszenzen, der maximal erreichten SNR-Werte sowie des Detektionslimits (LOD) für unterschiedliche Substrate. . . . .	44
3.3. Vergleich unterschiedlicher Oberflächen und Spottingpuffer bei Verwendung eines Kontaktdruckers. . . . .	51
3.4. Vergleich unterschiedlicher Oberflächen und Spottingpuffer bei Verwendung eines kontaktfreien Druckers. . . . .	52
3.5. Verlauf der Signalintensität im Microarray-Experiment nach 16 Tagen in Abhängigkeit vom Microarray-Substrat. . . . .	54
3.6. SNR-Analyse der mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Proteinen und Proteingemischen inkubierten Microarrays im Cy3 Kanal (532 nm). Korrekt positive Signale wurden grün hervorgehoben. . . . .	55
3.7. SNR-Analyse der mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Proteinen und Proteingemischen inkubierten Microarrays im Cy5 Kanal (635 nm). Korrekt positive Signale wurden grün hervorgehoben, falsch positive rot. . . . .	56
3.8. Versuch der Quantifizierung von Bste-His in den verschiedenen Fraktionen der Proteinaufreinigung. . . . .	58
3.9. Vergleich Microarray/ELISA in Anlehnung an Mezzasoma et al.(2002) [109]	61
4.1. Detektionslimit für IgG in Abhängigkeit vom verwendeten Format. . . . .	68
1.1. Unterschiede zwischen Aptameren und Antikörpern. . . . .	76
1.2. Übersicht über unterschiedliche publizierte Sensoren bei denen Aptamere eingesetzt werden. . . . .	88
1.3. Übersicht über publizierte Aptamer-Microarrays. . . . .	89
3.1. Auflistung der verwendeten His-getaggten Proteine. Die Plasmide zur Expression der Esterasen wurden von Prof. Uwe Bornscheuer (Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt, der Stamm <i>E. coli</i> JM109 pET-bgl-his von Prof. Karl Friehs (Universität Bielefeld). . . . .	110



# Literaturverzeichnis

- [1] N. L. Anderson and N. G. Anderson. The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 1:845 – 867, 2002.
- [2] B. F. Anthony, I. E. Concepcion, N. F. Concepcion, C. M. Vadheim, and J. Tiwari. Relation between maternal age and serum concentration of igg antibody to type iii group b streptococci. *J Infect Dis*, 170(3):717–20, 1994.
- [3] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, and A. Mirzabekov. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem*, 278:123 – 131, 2000.
- [4] V. Balasubramanian, L. T. Nguyen, S. V. Balasubramanian, and M. Ramathan. Interferon-gamma-inhibitory oligodeoxynucleotides alter the conformation of interferon-gamma. *Mol Pharmacol*, 53(5):926–32, 1998.
- [5] E. Baldrich, A. Restrepo, and C. K. O’Sullivan. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Anal Chem*, 76(23):7053–63, 2004.
- [6] G. S. Bang, S. Cho, and B. G. Kim. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. *Biosens Bioelectron*, 21(6):863–70, 2005.
- [7] R. T. Batey, R. P. Rambo, and J. A. Doudna. Tertiary motifs in rna structure and folding. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38(16):2326–2343, 1999.
- [8] C. Battaglia, G. Salani, C. Consolandi, L. R. Bernardi, and G. De Bellis. Analysis of dna microarrays by non-destructive fluorescent staining using sybr green ii. *Biotechniques*, 29(1):78–81, 2000.
- [9] J. A. Bittker, B. V. Le, and D. R. Liu. Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nat Biotechnol*, 20(10):1024–9, 2002.
- [10] M. Blank and M. Blind. Aptamers as tools for target validation. *Current Opinion In Chemical Biology*, 9(4):336–342, 2005.
- [11] M. Blind, W. Kolanus, and M. Famulok. Cytoplasmic rna modulators of an inside-out signal-transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3606–10, 1999.
- [12] C. Bock, M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, and D. Zichi. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics*, 4(3):609–18, 2004.
- [13] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole. Selection of single-stranded dna molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355(6360):564–6, 1992.
- [14] R. R. Breaker. Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology. *Nature*, 432(7019):838–45, 2004.
- [15] P. Burgstaller, A. Girod, and M. Blind. Aptamers as tools for target prioritization and lead identification. *Drug Discov Today*, 7(24):1221–8, 2002.

- [16] D. H. Burke and D. G. Nickens. Expressing rna aptamers inside cells to reveal proteome and ribonome function. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 1(2):169–88, 2002.
- [17] P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, and A. D. Keefe. Direct in vitro selection of a 2'-o-methyl aptamer to vegf. *Chem Biol*, 12(1):25–33, 2005.
- [18] E. J. Cho, J. R. Collett, A. E. Szafranska, and A. D. Ellington. Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets. *Analytica Chimica Acta*, 564(1):82–90, 2006.
- [19] S. L. Clark and V. T. Remcho. Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 23(9):1335–40, 2002.
- [20] J. R. Collett, E. J. Cho, and A. D. Ellington. Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*, 37(1):4–15, 2005.
- [21] J. R. Collett, E. J. Cho, J. F. Lee, M. Levy, A. J. Hood, C. Wan, and A. D. Ellington. Functional rna microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers. *Anal Biochem*, 338(1):113–23, 2005.
- [22] G. J. Connell, M. Illangesekare, and M. Yarus. Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites. *Biochemistry*, 32(21):5497–502, 1993.
- [23] J. C. Cox, A. Hayhurst, J. Hesselberth, T. S. Bayer, G. Georgiou, and A. D. Ellington. Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res*, 30(20):e108, 2002.
- [24] J. C. Cox, M. Rajendran, T. Riedel, E. A. Davidson, L. J. Sooter, T. S. Bayer, M. Schmitz-Brown, and A. D. Ellington. Automated acquisition of aptamer sequences. *Comb Chem High Throughput Screen*, 5(4):289–99, 2002.
- [25] J. C. Cox, P. Rudolph, and A. D. Ellington. Automated rna selection. *Biotechnol Prog*, 14(6):845–50, 1998.
- [26] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, and R. T. Kennedy. Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal Chem*, 73(22):5415–21, 2001.
- [27] M. B. Doyle, S. A. Murphy. Aptamers and methods for their in vitro selection and uses thereof. *Patent Application Publication*, US 2005/0142582 A1, 2005. US 2005/0142582 A1.
- [28] D. E. Draper. A guide to ions and rna structure. *Rna*, 10(3):335–43, 2004.
- [29] D. W. Drolet, R. D. Jenison, D. E. Smith, D. Pratt, and B. J. Hicke. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (selex). *Comb Chem High Throughput Screen*, 2(5):271–8, 1999.
- [30] D. W. Drolet, L. Moon-McDermott, and T. S. Romig. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol*, 14(8):1021–5, 1996.
- [31] B. E. Eaton, L. Gold, and D. A. Zichi. Let's get specific: the relationship between specificity and affinity. *Chem Biol*, 2(10):633–8, 1995.
- [32] R. P. Ekins. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal*, 7:155 – 168, 1989.
- [33] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of rna molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–22, 1990.
- [34] A. D. Ellington and J. W. Szostak. Selection in vitro of single-stranded dna molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355(6363):850–2, 1992.

- [35] D. Eulberg, K. Buchner, C. Maasch, and S. Klussmann. Development of an automated in vitro selection protocol to obtain rna-based aptamers: identification of a biostable substance p antagonist. *Nucleic Acids Res*, 33(4):e45, 2005.
- [36] N. J. Faergeman, B. W. Sigurskjold, B. B. Kragelund, K. V. Andersen, and J. Knudsen. Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme a binding protein studied by titration calorimetry. *Biochemistry*, 35(45):14118–14126, 1996.
- [37] M. Famulok. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr Opin Struct Biol*, 9(3):324–9, 1999.
- [38] M. Famulok. Turning aptamers into anticoagulants. *Nat Biotechnol*, 22(11):1373–4, 2004.
- [39] M. Famulok, M. Blind, and G. Mayer. Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chem Biol*, 8(10):931–9, 2001.
- [40] M. Famulok and G. Mayer. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol*, 243:123–36, 1999.
- [41] M. Famulok and G. Mayer. Intramers and aptamers: applications in protein-function analyses and potential for drug screening. *Chembiochem*, 6(1):19–26, 2005.
- [42] M. Famulok, G. Mayer, and M. Blind. Nucleic acid aptamers—from selection in vitro to applications in vivo. *Acc Chem Res*, 33(9):591–9, 2000.
- [43] M. Famulok and S. Verma. In vivo-applied functional rnas as tools in proteomics and genomics research. *Trends Biotechnol*, 20(11):462–6, 2002.
- [44] O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T. N. Tran, D. A. Lavan, and R. Langer. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64(21):7668–72, 2004.
- [45] J. Feigon, T. Dieckmann, and F. W. Smith. Aptamer structures from alpha to zeta. *Chem Biol*, 3(8):611–7, 1996.
- [46] J. A. Ferguson, T. C. Boles, C. P. Adams, and D. R. Walt. A fiber-optic dna biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nat Biotechnol*, 14(13):1681–4, 1996.
- [47] T. H. Finlay, V. Troll, M. Levy, A. J. Johnson, and L. T. Hodgins. New methods for the preparation of biospecific adsorbents and immobilized enzymes utilizing trichloro-s-triazine. *Anal Biochem*, 87(1):77–90, 1978.
- [48] R. Fisler. Toward miniaturization of protein microarray substrates. *American Biotechnology Laboratory*, January 2004:23–25, 2004.
- [49] H. Ge. Upa, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-dna, protein-rna and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Res*, 28(2):e3, 2000.
- [50] K. Gebhardt, A. Shokraei, E. Babaie, and B. H. Lindqvist. Rna aptamers to s-adenosylhomocysteine: kinetic properties, divalent cation dependency, and comparison with anti-s-adenosylhomocysteine antibody. *Biochemistry*, 39(24):7255–65, 2000.
- [51] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, and M. Famulok. Rna aptamers that bind l-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, 24(6):1029–36, 1996.
- [52] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, and M. Yarus. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, 64:763–97, 1995.
- [53] L. S. Green, C. Bell, and N. Janjic. Aptamers as reagents for high-throughput screening. *Biotechniques*, 30(5):1094–6, 1098, 1100 passim, 2001.

- [54] L. C. Griffin, J. J. Toole, and L. L. Leung. The discovery and characterization of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor. *Gene*, 137(1):25–31, 1993.
- [55] S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold. Correlation between protein and mrna abundance in yeast. *Mol Cell Proteomics*, 19:1720–1730, 1999.
- [56] B. B. Haab, M. J. Dunham, and P. O. Brown. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*, 2(2):1465–6914, 2001.
- [57] N. Hamaguchi, A. Ellington, and M. Stanton. Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal Biochem*, 294(2):126–31, 2001.
- [58] J. Hamm. Characterisation of antibody-binding rnas selected from structurally constrained libraries. *Nucleic Acids Res*, 24(12):2220–7, 1996.
- [59] M Helm. Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of rna. *Nucleic Acids Research*, 34(2):721–733, 2006.
- [60] T. Hermann and D. J. Patel. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, 287(5454):820–5, 2000.
- [61] B. J. Hicke and A. W. Stephens. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest*, 106(8):923–8, 2000.
- [62] B. J. Hicke, S. R. Watson, A. Koenig, C. K. Lynott, R. F. Bargatze, Y. F. Chang, S. Ringquist, L. Moon-McDermott, S. Jennings, T. Fitzwater, H. L. Han, N. Varki, I. Albinana, M. C. Willis, A. Varki, and D. Parma. Dna aptamers block l-selectin function in vivo. inhibition of human lymphocyte trafficking in scid mice. *J Clin Invest*, 98(12):2688–92, 1996.
- [63] J. Hobbs, H. Sternbach, M. Sprinzl, and F. Eckstein. Polynucleotides containing 2'-amino-2'-deoxyribose and 2'-azido-2'-deoxyribose. *Biochemistry*, 12(25):5138–45, 1973.
- [64] I. L. Hofacker. Vienna rna secondary structure server. *Nucleic Acids Res*, 31:3429 – 3431, 2003.
- [65] H. P. Hofmann, S. Limmer, V. Hornung, and M. Sprinzl. Ni<sup>2+</sup>-binding rna motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a g-a base pair. *Rna*, 3(11):1289–300, 1997.
- [66] M. Hollas, E. Jallerat, K. Pflanz, I. Praulich, J.-G. Walter, F. Stahl, and T. Scheper. New 3d black substrate for protein microarrays with improved dynamic range. *Desalination*, 199:230–231, 2006.
- [67] M. Homann and H. U. Goringe. Uptake and intracellular transport of rna aptamers in african trypanosomes suggest therapeutic "piggy - back" approach. *Bioorg Med Chem*, 9(10):2571–80, 2001.
- [68] D. E. Huizenga and J. W. Szostak. A dna aptamer that binds adenosine and atp. *Biochemistry*, 34(2):656–65, 1995.
- [69] S. D. Jayasena. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*, 45(9):1628–50, 1999.
- [70] D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, C. K. Lynott, N. Gill, C. Vargeese, G. Kirschenheuter, D. P. McGee, P. Abesinghe, W. A. Pieken, and et al. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine rna inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 34(36):11363–72, 1995.
- [71] D. Jellinek, C. K. Lynott, D. B. Rifkin, and N. Janjic. High-affinity rna ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23):11227–31, 1993.

- [72] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. High-resolution molecular discrimination by rna. *Science*, 263(5152):1425–9, 1994.
- [73] R. D. Jenison, S. D. Jennings, D. W. Walker, R. F. Bargatze, and D. Parma. Oligonucleotide inhibitors of p-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 8(4):265–79, 1998.
- [74] K. B. Jensen, B. L. Atkinson, M. C. Willis, T. H. Koch, and L. Gold. Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 rev protein to high-affinity rna ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26):12220–4, 1995.
- [75] S. Jhaveri, M. Rajendran, and A. D. Ellington. In vitro selection of signaling aptamers. *Nat Biotechnol*, 18(12):1293–7, 2000.
- [76] N. Jing, R. F. Rando, Y. Pommier, and M. E. Hogan. Ion selective folding of loop domains in a potent anti-hiv oligonucleotide. *Biochemistry*, 36(41):12498–505, 1997.
- [77] K. D. Jones. Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes, part 1: principles. *IVD Technol.*, 5:32 – 41, 1999.
- [78] T. O. Joos, M. Schrenk, P. Hopfl, K. Kroger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schorner, M. Durr, K. Herick, S. Rupp, K. Sohn, and H. Hammerle. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 21(13):2641–50, 2000.
- [79] G. F. Joyce. In vitro evolution of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol*, 4:331–6, 1994.
- [80] R. Kirby, E. J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y. S. Park, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, and A. D. Ellington. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Anal Chem*, 76(14):4066–75, 2004.
- [81] Ö. Kökpinar, D. Harkensee, C. Kasper, T. Scheper, R. Zeidler, O.-W. Reif, and R. Ulber. Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification. *Biotechnol Prog*, 22(4):1215–1219, 2006.
- [82] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann, and J. P. Furst. Mirror-image rna that binds d-adenosine. *Nat Biotechnol*, 14(9):1112–5, 1996.
- [83] T. Kodadek. Protein microarrays: prospects and problems. *Chem Biol*, 8(2):105–15, 2001.
- [84] M. F. Kubik, A. W. Stephens, D. Schneider, R. A. Marlar, and D. Tasset. High-affinity rna ligands to human alpha-thrombin. *Nucleic Acids Res*, 22(13):2619–26, 1994.
- [85] T. Kukar, S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, M. Megginson, J. X. She, and D. Wu. Protein microarrays to detect protein-protein interactions using red and green fluorescent proteins. *Anal Biochem*, 306(1):50–4, 2002.
- [86] W. Kusnezow and J. D. Hoheisel. Solid supports for microarray immunoassays. *J Mol Recognit*, 16(4):165–76, 2003.
- [87] W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl, and J. D. Hoheisel. Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics*, 3(3):254–64, 2003.
- [88] N. E. Labrou. Design and selection of ligands for affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 790(1-2):67–78, 2003.
- [89] B. H. Lee and T. Nagamune. Protein microarrays and their applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(2):69–75, 2004.
- [90] J. F. Lee, J. R. Hesselberth, L. A. Meyers, and A. D. Ellington. Aptamer database. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue):D95–100, 2004.

- [91] M. Lee and D. R. Walt. A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem*, 282(1):142–6, 2000.
- [92] Y. Li, H. J. Lee, and R. M. Corn. Detection of protein biomarkers using rna aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem*, 79(3):1082–8, 2007.
- [93] Y. Lin, Q. Qiu, S. C. Gill, and S. D. Jayasena. Modified rna sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res*, 22(24):5229–34, 1994.
- [94] M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, and E. Prohaska. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem*, 74(17):4488–95, 2002.
- [95] J. R. Lorsch and J. W. Szostak. In vitro selection of rna aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*, 33(4):973–82, 1994.
- [96] B. Lu, M. R. Smyth, and R. O’Kennedy. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*, 121:29R – 32R, 1996.
- [97] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, and J. Feigon. Thrombin-binding dna aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8):3745–9, 1993.
- [98] G. MacBeath. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet*, 32 Suppl:526–32, 2002.
- [99] G. MacBeath and S. L. Schreiber. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289(5485):1760–3, 2000.
- [100] J. Madoz-Gurpide, H. Wang, D. E. Misek, F. Brichory, and S. M. Hanash. Protein based microarrays: a tool for probing the proteome of cancer cells and tissues. *Proteomics*, 1(10):1279–87, 2001.
- [101] C. Maercker. Protein arrays in functional genome research. *Biosci Rep*, 25(1-2):57–70, 2005.
- [102] C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, and G. P. Tocchini-Valentini. In vitro selection of dopamine rna ligands. *Biochemistry*, 36(32):9726–34, 1997.
- [103] X. Mao, L. A. Marky, and W. H. Gmeiner. Nmr structure of the thrombin-binding dna aptamer stabilized by sr2+. *J Biomol Struct Dyn*, 22(1):25–33, 2004.
- [104] K. A. Marshall, 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*, 5(6):729–34, 1997.
- [105] T. Martinsky. Protein microarray manufacturing. *PharmaGenomics*, March/April:42–48, 2004.
- [106] G. Mayer and A. Jenne. Aptamers in research and drug development. *BioDrugs*, 18(6):351–9, 2004.
- [107] T. G. McCauley, N. Hamaguchi, and M. Stanton. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Anal Biochem*, 319(2):244–50, 2003.
- [108] K. M. Meisenheimer, P. L. Meisenheimer, and T. H. Koch. Nucleoprotein photo-cross-linking using halopyrimidine-substituted rnas. *Methods Enzymol*, 318:88–104, 2000.
- [109] L. Mezzasoma, T. Bacarese-Hamilton, M. Di Cristina, R. Rossi, F. Bistoni, and A. Crisanti. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*, 48(1):121–30, 2002.



- [110] C. Mircean, I. Shmulevich, D. Cogdell, W. Choi, Y. Jia, I. Tabus, S. R. Hamilton, and W. Zhang. Robust estimation of protein expression ratios with lysate microarray technology. *Bioinformatics*, 21(9):1935–42, 2005.
- [111] J. A. Mondragon-Sanchez, J. Liquier, R. H. Shafer, and E. Taillandier. Tetraplex structure formation in the thrombin-binding dna aptamer by metal cations measured by vibrational spectroscopy. *J Biomol Struct Dyn*, 22(3):365–73, 2004.
- [112] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, and S. A. Doyle. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res*, 31(18):e110, 2003.
- [113] D. Nieuwlandt, M. Wecker, and L. Gold. In vitro selection of rna ligands to substance p. *Biochemistry*, 34(16):5651–9, 1995.
- [114] A. Nolte, S. Klussmann, R. Bald, V. A. Erdmann, and J. P. Furste. Mirror-design of l-oligonucleotide ligands binding to l-arginine. *Nat Biotechnol*, 14(9):1116–9, 1996.
- [115] R. Nutiu and Y. Li. Aptamers with fluorescence-signaling properties. *Methods*, 37(1):16–25, 2005.
- [116] C. K. O’Sullivan. Aptasensors—the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem*, 372(1):44–8, 2002.
- [117] N. C. Pagnatis, C. Bell, Y. F. Chang, S. Jennings, T. Fitzwater, D. Jellinek, and C. Dang. Potent 2’-amino-, and 2’-fluoro-2’-deoxyribonucleotide rna inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol*, 15(1):68–73, 1997.
- [118] W. Pan, R. C. Craven, Q. Qiu, C. B. Wilson, J. W. Wills, S. Golovine, and J. F. Wang. Isolation of virus-neutralizing rnas from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25):11509–13, 1995.
- [119] D. J. Patel, A. K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R. A. Kumar, and S. Nonin. Structure, recognition and adaptive binding in rna aptamer complexes. *J Mol Biol*, 272(5):645–64, 1997.
- [120] S. D. Patil, D. G. Rhodes, and D. J. Burgess. Dna-based therapeutics and dna delivery systems: a comprehensive review. *Aaps J*, 7(1):E61–77, 2005.
- [121] S. D. Patterson and R. H. Aebersold. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*, 33 Suppl:311–23, 2003.
- [122] C. Paul, R. Baurain, G. Gahrton, and C. Peterson. Determination of daunorubicin and its main metabolites in plasma, urine and leukaemic cells in patients with acute myeloblastic leukaemia. *Cancer Lett.*, 9:263 – 269, 1980.
- [123] P. Peluso, D. S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L. S. Jung, P. Wagner, and S. Nock. Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal Biochem*, 312(2):113–24, 2003.
- [124] P. S. Pendergrast, H. N. Marsh, D. Grate, J. M. Healy, and M. Stanton. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J Biomol Tech*, 16(3):224–34, 2005.
- [125] M. L. Phelan and S. Nock. Generation of bioreagents for protein chips. *Proteomics*, 3(11):2123–34, 2003.
- [126] W. A. Pieken, D. B. Olsen, F. Benseler, H. Aurup, and F. Eckstein. Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2’-modified hammerhead ribozymes. *Science*, 253(5017):314–7, 1991.
- [127] P. Porschewski, M. A. Grattinger, K. Klenzke, A. Erpenbach, M. R. Blind, and F. Schafer. Using aptamers as capture reagents in bead-based assay systems for diagnostics and hit identification. *J Biomol Screen*, 11(7):773–81, 2006.

- [128] R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, and G. M. Hieftje. Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal Chem*, 70(16):3419–25, 1998.
- [129] D. Proske, M. Blank, R. Buhmann, and A. Resch. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69(4):367–74, 2005.
- [130] D. Proske, M. Hoffliger, R. M. Soll, A. G. Beck-Sickinger, and M. Famulok. A  $\gamma$ 2 receptor mimetic aptamer directed against neuropeptide  $\gamma$ . *Journal of biological chemistry*, 277(13):11416–11422, 2002.
- [131] M. Rajendran and A. D. Ellington. Selecting nucleic acids for biosensor applications. *Comb Chem High Throughput Screen*, 5(4):263–70, 2002.
- [132] M. Rajendran and A. D. Ellington. In vitro selection of molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, 31(19):5700–13, 2003.
- [133] A. Ramaswamy, E. Lin, I. Chen, R. Mitra, J. Morrisett, K. Coombes, Z. Ju, and M. Kapoor. Application of protein lysate microarrays to molecular marker verification and quantification. *Proteome Sci*, 3:9, 2005.
- [134] M. Reck, F. Stahl, J.-G. Walter, M. Hollas, D. Melzner, and T. Scheper. Optimization of a microarray sandwich-elisa against hinf-gamma on a modified nitrocellulose membrane. *Biotechnol Prog*, 23(6):1498–1505, 2007.
- [135] D. L. Robertson and G. F. Joyce. Selection in vitro of an rna enzyme that specifically cleaves single-stranded dna. *Nature*, 344(6265):467–8, 1990.
- [136] A. Roda, M. Gardigli, C. Russo, P. Pasini, and M. Baraldini. Protein microdeposition using a conventional ink-jet printer. *Biotechniques*, 28:492 – 496, 2000.
- [137] T. S. Romig, C. Bell, and D. W. Drolet. Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 731(2):275–84, 1999.
- [138] A. Y. Rubina, E. I. Dementieva, A. A. Stomakhin, E. L. Darii, S. V. Pan'kov, V. E. Barsky, S. M. Ivanov, E. V. Konovalova, and A. D. Mirzabekov. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques*, 34(5):1008–14, 1016–20, 1022, 2003.
- [139] A. Y. Rubina, V. I. Dyukova, E. I. Dementieva, A. A. Stomakhin, V. A. Nesmeyanov, E. V. Grishin, and A. S. Zasedatelev. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Anal Biochem*, 340(2):317–29, 2005.
- [140] C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, Jr. Quick, G., E. Scardino, W. P. Fay, and B. A. Sullenger. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol*, 22(11):1423–8, 2004.
- [141] V. Sakanyan. High-throughput and multiplexed protein array technology: protein-dna and protein-protein interactions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 815(1-2):77–95, 2005.
- [142] J. SantaLucia. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide dna nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1460 – 1465, 1998.
- [143] M. Sassanfar and J. W. Szostak. An rna motif that binds atp. *Nature*, 364(6437):550–3, 1993.
- [144] C. A. Savran, S. M. Knudsen, A. D. Ellington, and S. R. Manalis. Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules. *Analytical Chemistry*, 76(11):3194–3198, 2004.
- [145] M. Schaeferling, S. Schiller, H. Paul, M. Kruschina, P. Pavlickova, M. Meerkamp, C. Giammasi, and D. Kambhampati. Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces. *Electrophoresis*, 23(18):3097–105, 2002.

- [146] M. D. Schlensog, T. M. A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, and E. Quandt. A love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 101(3):308–315, 2004.
- [147] D. Smith, B. D. Collins, J. Heil, and T. H. Koch. Sensitivity and specificity of photoaptamer probes. *Mol Cell Proteomics*, 2(1):11–8, 2003.
- [148] N. L. Smith and H. M. Lenhoff. Covalent binding of proteins and glucose-6-phosphate dehydrogenase to cellulosic carriers activated with s-triazine trichloride. *Anal Biochem*, 61(2):392–415, 1974.
- [149] P. L. Southwick, L. A. Ernst, E. W. Tauriello, S. R. Parker, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, H. A. Clever, and A. S. Waggoner. Cyanine dye labeling reagents—carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry*, 11(3):418–30, 1990.
- [150] V. A. Spiridonova and A. M. Kopylov. Dna aptamers as radically new recognition elements for biosensors. *Biochemistry (Mosc)*, 67(6):706–9, 2002.
- [151] A. Sreekumar. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res*, 61:7585 – 7593, 2001.
- [152] K. Stadtherr, H. Wolf, and P. Lindner. An aptamer-based protein biochip. *Anal Chem*, 77(11):3437–43, 2005.
- [153] B. A. Stillman and J. L. Tonkinson. Fast slides: a novel surface for microarrays. *Biotechniques*, 29(3):630–5, 2000.
- [154] S. Suchyta. Protein microarrays on nitrocellulose slides. *Genetic Engineering News*, 26(2):28–28, 2006.
- [155] D. Sussman, J. C. Nix, and C. Wilson. The structural basis for molecular recognition by the vitamin b 12 rna aptamer. *Nat Struct Biol*, 7(1):53–7, 2000.
- [156] D. M. Tasset, M. F. Kubik, and W. Steiner. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol*, 272(5):688–98, 1997.
- [157] J. L. Tonkinson and B. A. Stillman. Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Front Biosci*, 7:c1–12, 2002.
- [158] E. Tuddenham. Rna as drug and antidote. *Nature*, 419(6902):23–4, 2002.
- [159] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Rna ligands to bacteriophage t4 dna polymerase. *Science*, 249(4968):505–10, 1990.
- [160] T. Urbanowska, S. Mangialaio, C. Hartmann, and F. Legay. Development of protein microarray technology to monitor biomarkers of rheumatoid arthritis disease. *Cell Biol Toxicol*, 19(3):189–202, 2003.
- [161] J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, and N. M. Vermeulen. A versatile solid support system for oligodeoxynucleotide probe-based hybridization assays. *Nucleic Acids Res*, 19(12):3345–3350, 1991.
- [162] J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, and N. M. Vermeulen. A versatile solid support system for oligodeoxynucleotide probe-based hybridization assays. *Nucleic Acids Res*, 19(12):3345–50, 1991.
- [163] C. J. Vanoss, R. J. Good, and M. K. Chaudhury. Mechanism of dna (southern) and protein (western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *Journal of Chromatography*, 391(1):53–65, 1987.
- [164] D. Verdnick, S. Handran, and S. Pickett. Key considerations for accurate microarray scanning and image analysis. In G. Kamberova, editor, *DNA image analysis: nuts and bolts*. DNA Press, Salem, Mass, 2002.

- [165] M. Vuyisich and P. A. Beal. Controlling protein activity with ligand-regulated rna aptamers. *Chem Biol*, 9(8):907–13, 2002.
- [166] K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofberger, S. Swaminathan, and P. H. Bolton. The tertiary structure of a dna aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity. *Biochemistry*, 32(42):11285–92, 1993.
- [167] K. Y. Wang, S. McCurdy, R. G. Shea, S. Swaminathan, and P. H. Bolton. A dna aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for dna. *Biochemistry*, 32(8):1899–904, 1993.
- [168] C. Wilson, J. Nix, and J. Szostak. Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding rna pseudoknot. *Biochemistry*, 37(41):14410–9, 1998.
- [169] A. Wochner, M. Menger, D. Orgel, B. Cech, M. Rimmele, V. A. Erdmann, and J. Gloekler. A dna aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Anal. Biochem.*, in press:doi: 10.1016/j.ab.2007.09.007, 2007.
- [170] R. Yamamoto-Fujita and P. K. Kumar. Aptamer-derived nucleic acid oligos: applications to develop nucleic acid chips to analyze proteins and small ligands. *Anal Chem*, 77(17):5460–6, 2005.
- [171] K. M. You, S. H. Lee, A. Im, and S. B. Lee. Aptamers as functional nucleic acids: In vitro selection and biotechnological applications. *Biotechnology and Bioprocess engineering*, 8(2):64–75, 2003.
- [172] H. Zhu. Analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293:2101–2105, 2001.

# Publikationen

**Systematic Investigation of Immobilization Parameters of Aptamers Applied to Protein-Microarrays;** Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; Analytical Chemistry, 80; 19 (2008) 7372-7378

**Aptamere in der Sensorik,** Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl; Chemie Ingenieur Technik, 80; 6 (2008) 771-781

**A novel Nitrocellulose based Surface Material for Protein Microarrays: reduced Autofluorescence and Improved Limit of Detection;** Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Michael Reck, Inka Praulich, Markus Hollas, Dieter Melzner, Thomas Scheper; eingereicht

**Automated Microscale His-tagged Protein Purification Using Ni-NTA Magnetic Agarose Beads;** Jin Meng, Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; Chemical Engineering and Technology, 31; 3 (2008) 463-468

**Optimization of a Microarray Sandwich-ELISA against hINF- $\gamma$  on a Modified Nitrocellulose Membrane;** Michael Reck, Frank Stahl, Johanna-Gabriela Walter, Markus Hollas, Dieter Melzner, Thomas Scheper; Biotechnology Progress 23; 6 (2007) 1498-1505

**New 3D black substrate for protein microarrays with improved dynamic range;** Markus Hollas, Eric Jallerat, Karl Pflanz, Inka Praulich, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper; Desalination 199 (2006) 230-231

**Schwarze Nitrocellulose als Substrat für Protein Microarrays;** Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Michael Reck, Markus Hollas, Dieter Melzner, Thomas Scheper; Chemie Ingenieur Technik 78; 9 (2006) 1391

**Fast Screening for the Purification of Proteins Using Membrane Adsorber Technology;** Daniela Harkensee, Öznur Kökpinar, Johanna-Gabriela Walter, Cornelia Kasper, Sascha Beutel, Oscar-Werner Reif, Thomas Scheper, Roland Ulber; Engineering in Life Science (2007) 388-394

**Human Growth Hormone (hGH) Purification From CHO-Cell Culture Supernatant Utilizing Macroporous Chromatographic Media;** Johanna-Gabriela Walter, Alexander Tappe, Cornelia Kasper, Oscar-Werner Reif, Thomas Scheper; Cell Technology for Cell Product; Springer-Verlag (2007) 635-641

**Fast and efficient protein purification from complex cell culture samples using membrane adsorber systems;** Kirstin Suck, Johanna Walter, Frauke Menzel, Alexander Tappe, Cornelia Kasper, Claudia Naumann, Robert Zeidler, Thomas Scheper; Journal of Biotechnology 121 (2006), S.361-367

**Membranadsorber in der Proteinaufreinigung;** Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Cornelia Kasper, Robert Zeidler, Claudia Naumann; BIOforum (2005) 1-2, S. 42-43



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Scheper für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung eines herausfordernden Themas, welches mir sehr ans Herz gewachsen ist.

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

Ein großes Dankeschön auch an PD Dr. Cornelia Kasper für die Übernahme des Korreferats und all ihre Unterstützung.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt bedanke ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Bei dem Gleichstellungsbüro der Leibniz Universität Hannover bedanke ich mich für die Promotionsabschlussförderung, die mir den Endspurt dieser Arbeit ermöglichte.

Mein Dank gilt auch allen Institutionen und Firmen, die diese Arbeit durch Überlassung von Material und Informationen sowie durch die Bereitstellung von Geräten unterstützt haben:

So bedanke ich mich bei der Sartorius Stedim Biotech für die Bereitstellung der Nitrocellulose-Membranen. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Markus Hollas und Dr. Uwe Andag für die gute Zusammenarbeit.

Bei der RiNA GmbH bedanke ich mich für die Bereitstellung des gegen Daunomycin gerichteten Aptamers und bei Dr. Jörn Glökler für die wertvollen Anregungen.

Bei Prof. Dr. Yuval Shoham möchte ich mich für die Ermöglichung der ITC-Messungen bedanken.

Dr. Thomas Reinard danke ich für die Ermöglichung der SPR-Messung, ganz besonders danke ich Isabell und Noel für die ständige Hilfsbereitschaft an der ESPRIT.

Bei Prof. Dr. Karl Friehs und Prof. Dr. Uwe Bornscheuer bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung der produzierenden Stämme und Plasmide.

Bei allen Mitarbeitern des TCI bedanke ich mich für die ausgesprochen angenehme Atmosphäre. Ganz besonders bedanke ich mich bei Martin Pähler, der im RNA Labor immer wieder erfolgreich gegen das Chaos kämpft.





Ein ganz herzliches Dankeschön auch an alle Hühner! Danke, dass ihr meine frustrierten Phasen ertragen und mit einem guten Wort oder dem einen oder anderen Stück Schokolade aufgefangen habt. Und auch in meinen euphorischen Momenten niemals mit dem Kopf geschüttelt habt. Ich habe es immer genossen in diesem bunten Büro sitzen zu dürfen. Durch die unterschiedlichen wissenschaftlichen Schwerpunkte und Charaktere meiner Mit-Hühner habe ich nicht nur fachlich dazugelernt.

Bei Öznur bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und wertvolle Ideen. Es war schön, mit Dir in einem Boot zu sitzen.

Auch außerhalb der Universität gibt es Menschen, die mich ausdauernd begleitet haben und denen mein ganz besonderer Dank gilt:

Meinem Bruder Karl-Henning danke ich für seine Überzeugungskünste und seine Hilfe mit LyX.

Bei Ümran bedanke ich mich für ihre Unterstützung und andauernde Freundschaft. Mit Dir kann man Luftschlösser bauen und Fundamente darunter setzen.

Stefan danke ich dafür, dass er da ist. Du hast mich und meine Sicht der Dinge verändert.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie.

Vor allem danke ich meiner Mutter. Danke für alle Liebe und Unterstützung und dafür, dass Du an mich glaubst.