



HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
UMWELTFORSCHUNG
UFZ

Dissertation 11/2007

**Aptamere als neue molekulare Erkennungselemente in
Biosensoren**

Christine Reinemann

ISSN 1860-0387

Aptamere
als neue molekulare Erkennungselemente
in Biosensoren

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplomingenieurin

Christine Reinemann

geboren am 21. Mai 1966 in Leipzig

Dekanin: Prof. Dr. Anette G. Beck-Sickinger

Gutachter: Prof. Dr. Anette G. Beck-Sickinger
Prof. Dr. Hauke Harms
Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Verteidigung: 08. Juni 2007

meinen Kindern

Felix und Lara Emilia

gewidmet

Bibliographische Beschreibung

Christine Reinemann

Aptamere als neue molekulare Erkennungselemente in Biosensoren

Universität Leipzig, Promotion

S. 135, Lit. 241, Abb. 60, Tab. 20

Referat

Biosensoren sind moderne Messsysteme, mit denen Analyten ohne zusätzliche Reaktionsschritte zur Probenaufbereitung durch Biorezeptoren erkannt werden. Die Selektivität wird dabei maßgebend von den eingesetzten Biorezeptoren bestimmt. Zu den neueren Entwicklungen auf diesem Gebiet gehören auch Aptamere. Diese kurzen einzelsträngigen Nukleinsäure-Oligomere binden ein Target mit hoher Affinität und Spezifität aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur. Ihre Gewinnung erfolgt in einer speziell an das Target angepassten *in vitro* Selektionsprozedur, dem so genannten SELEX-Prozess. Dieser Kreisprozess zielt darauf ab, aus einer randomisierten Oligonukleotidbibliothek schrittweise für das Target spezifische und affine Nukleinsäuremoleküle anzureichern. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Methode des FluMag-SELEX einerseits Aptamere generiert, die in der Lage sind, Bestandteile eines sehr komplexen Targets (Schimmelpilzsporen) zu binden und andererseits solche, die ein äußerst einfach strukturiertes Molekül (Ethanolamin) detektieren können.

In einem der durchgeführten SELEX-Prozesse konnten Aptamere gewonnen werden, die das Potenzial haben, problematischen Schimmelpilzbefall zu detektieren. Der angereicherte Aptamerpool, selektiert unter Einsatz der löslichen Fraktion von *Penicillium expansum* Sporen als Target, war in der Lage, Bestandteile dieser Pilzart zu erkennen. In nachfolgenden Bindungsversuchen zur Charakterisierung der einzelnen Aptamerklone konnte für drei Klone eine eindeutige Bindung zu einzelnen Sporenproteinen nachgewiesen werden. Um welche Proteine es sich dabei handelt, muss in weitergehenden Analysen geklärt werden. Ein anderer in diesem Prozess selektierter Aptamerklon zeigte eine definierte Bindung zu Ethylamin-Strukturen.

In einem weiteren SELEX-Prozess wurden Aptamere für das bisher kleinste Aptamertarget Ethanolamin selektiert. Ethanolamin spielt im natürlichen Kontext als eines der wichtigsten Kopfgruppenelemente von Phospholipiden eine große Rolle beim Aufbau von biologischen Membranen. Chemisch synthetisiert wird es in der Industrie, der Medizin und der Forschung eingesetzt. Die isolierten Aptamere enthalten einen 16-basigen, besonders Guanin-haltigen Konsensusbereich. Die Affinitätskonstanten der einzelnen Aptamerklone, bestimmt für immobilisiertes Ethanolamin, liegen im nanomolaren Bereich (6–19 nM). Die Aptamere binden spezifisch an Ethylamin-Strukturen im Target. Im Unterschied zur Hydroxylgruppe des Ethanolamins, die für die Bindung nicht erforderlich war, war die Aminogruppe für die Aptamerbindung essentiell. Diese musste als primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe vorliegen, damit eine Bindung erfolgte. Moleküle, die ausschließlich quartäre Amine oder Aminogruppen in ionisierter Form enthielten, wurden nicht gebunden. Auch phosphorylierte Ethanolamin-Verbindungen wurden von den Aptameren nicht erkannt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
2 Zielstellung.....	2
3 Theoretischer Teil.....	4
3.1 <i>Biosensoren</i>	4
3.1.1 Aufbau und Funktion	4
3.1.2 Transducer	5
3.1.3 Biorezeptoren	7
3.2 <i>Aptamere</i>	8
3.2.1 Struktur und Funktionsweise	8
3.2.2 Eigenschaften von Aptameren	11
3.2.3 Einsatz von Aptameren	12
3.2.4 <i>in vitro</i> Selektion zur Gewinnung von Aptameren	12
3.2.4.1 Prinzip.....	12
3.2.4.2 SELEX-Varianten	15
3.2.4.3 FluMag-SELEX.....	16
3.3 <i>Verwendete Targets für die Aptamergewinnung</i>	17
3.3.1 Schimmelpilzsporen	17
3.3.1.1 Schimmelpilze	17
3.3.1.2 Etablierte Nachweismethoden.....	19
3.3.1.3 Konidien und deren Bestandteile als Targets im SELEX-Prozess.....	20
3.3.2 Ethanolamin.....	23
4 Experimenteller Teil	27
4.1 <i>Geräte und Materialien</i>	27
4.2 <i>Präparation von Schimmelpilzsporen</i>	27
4.2.1 Gewinnung der Sporen.....	27
4.2.2 Sporen-Vorbehandlungen	28
4.2.3 Aufschluss der Sporen	29
4.3 <i>Allgemeine Nukleinsäuretechniken</i>	30
4.3.1 Quantifizierung	30
4.3.2 Ethanolfällung.....	31

4.3.3	Gelelektrophorese	31
4.3.4	Gelelution.....	33
4.4	<i>Arbeitstechniken im Umgang mit Proteinen</i>	33
4.4.1	Proteinbestimmung.....	33
4.4.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA).....	34
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
4.4.4	Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen	35
4.5	<i>SELEX-Prozess</i>	35
4.5.1	Prinzip des ssDNA-SELEX-Prozesses.....	35
4.5.2	Oligonukleotid-Bibliothek und Primer	36
4.5.3	Targets.....	37
4.5.3.1	Intakte Schimmelpilzsporen.....	37
4.5.3.2	Lösliche Sporenfraktion	38
4.5.3.3	Laminarin	39
4.5.3.4	Ethanolamin	40
4.5.4	Durchführung des SELEX-Prozesses	41
4.6	<i>Klonierung selektierter Aptamer-DNA</i>	45
4.6.1	Klonierung selektierter DNA nach der letzten SELEX-Runde	45
4.6.2	Überprüfung der Transformanten mittels Kolonie-PCR.....	46
4.6.3	Präparation von pDNA.....	48
4.7	<i>Sequenzanalyse individueller Aptamerklone</i>	49
4.7.1	Sequenzierung.....	49
4.7.2	Sequenz- und Strukturanalyse	49
4.8	<i>Bindungsversuche mit individuellen Aptameren</i>	50
4.8.1	Bindungsversuche mit immobilisiertem Target.....	50
4.8.2	Affinitäts-Elutionen.....	51
4.8.3	Versuche mit dem IAsys-Affinitätssensor	52
4.8.4	Affinitätsreinigung mit Aptameren.....	55
5	Ergebnisse	56
5.1	<i>Aptamere für Schimmelpilzsporen</i>	56
5.1.1	<i>in vitro</i> Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Schimmelpilze	56
5.1.1.1	Vorbehandelte Sporen als Target.....	56
5.1.1.2	Immobilisiertes β -Glucan als Target.....	62
5.1.1.3	Lösliche Sporenfraktion als Target.....	67
5.1.2	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	71
5.1.2.1	Einteilung der Sequenzen nach Primärstruktur	71
5.1.2.2	Analyse der Sekundärstrukturen	75
5.1.3	Bindungsstudien mit individuellen Aptameren.....	78
5.1.3.1	Bindungsstudien mit immobilisierter löslicher Sporenfraktion	78
5.1.3.2	Messungen im IAsys-Affinitätssensor.....	80
5.1.3.3	Affinitätsreinigung mit Aptameren.....	83

5.2	<i>Aptamere für Ethanolamin</i>	85
5.2.1	SELEX zur Gewinnung von Aptameren für Ethanolamin.....	85
5.2.2	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	88
5.2.2.1	Einteilung der Sequenzen nach Primärstruktur.....	88
5.2.2.2	Analyse der Sekundärstrukturen.....	93
5.2.3	Bindungsstudien mit individuellen Aptameren.....	95
5.2.3.1	Bindungseffizienz der individuellen Aptamerklone.....	95
5.2.3.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	97
5.2.3.3	Affinitätselution zur Bestimmung der Kreuzreaktivität.....	100
6	Diskussion und Ausblick	113
6.1	<i>Selektion von Aptameren für Schimmelpilzbestandteile</i>	113
6.1.1	Selektionsexperimente für ganze Schimmelpilzsporen.....	113
6.1.2	Selektionsexperimente für β -Glucan.....	114
6.1.3	Aptamere für die lösliche Sporenfraktion.....	116
6.1.4	Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial.....	119
6.2	<i>Selektion von Aptameren für Ethanolamin</i>	119
6.2.1	SELEX-Prozess zur Gewinnung der Aptamere.....	119
6.2.2	Beurteilung der gewonnenen Aptamersequenzen.....	121
6.2.3	Betrachtung der Bindungsversuche.....	123
6.2.4	Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial.....	129
6.3	<i>Ähnlichkeit von Aptameren aus verschiedenen SELEX-Prozessen</i>	130
6.3.1	Vergleich von Aptameren aus SELEX SL1 und SP13.....	130
6.3.2	Vergleich mit Aptameren aus der Literatur.....	131
6.3.3	Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial.....	133
7	Zusammenfassung	134
8	Literaturverzeichnis	136
	Eigene Arbeiten	i
	Erklärung	ii
	Danksagung	iii
	Lebenslauf	iv

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Kap.	Kapitel
Tab.	Tabelle
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
s.o.	siehe oben
n.b.	nicht bestimmt
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
mind.	mindestens
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
pDNA	Plasmid-Desoxyribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ÜN	über Nacht
OD	optische Dichte
UV	ultraviolett
mod	modifiziert
spp.	species pluralis (mehrere Spezies)
p.a.	pro analysi (Reinheitsgrad: zur Analyse)
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser, Reinstwasser)
LB	Luria-Bertrani-Broth
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
APS	Ammoniumpersulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TCA	Trichloressigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
PAA	Polyacrylamid
EA	Ethanolamin
Na	Natrium
C	Kohlenstoff
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
N	variable Base (Cytosin, Guanin, Adenin, Thymin; Ambiguity Code)
H	variable Base (Cytosin, Adenin, Thymin; Ambiguity Code)
Y	variable Base (Cytosin, Thymin; Ambiguity Code)
M	variable Base (Cytosin, Adenin; Ambiguity Code)

W	variable Base (Adenin, Thymin; Ambiguity Code)
K_D	Dissoziationskonstante
B_{max}	Zahl der möglichen Bindungsstellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELONA	Enzyme Linked Oligonucleotide Assay
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (<i>in vitro</i> Selektionsprozess)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
AL	Ausgangslösung
NB	Nichtbinder
W	Waschfraktion
E	Eluat
M	mol/Liter
nt	Nukleotide
bp	Basenpaar
arc sec	Winkelsekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius
K	Kelvin
g	Gramm
L	Liter
m	Meter
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
Hz	Hertz
V	Volt
Da	Dalton
k	Kilo
m	milli
μ	mikro
n	nano
p	pico

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Schematischer Aufbau von Biosensoren.....	4
Abb. 3.2:	Prinzip der Resonant Mirror Spektroskopie.....	7
Abb. 3.3:	Funktionsweise von Aptameren	9
Abb. 3.4:	Prinzip des SELEX	13
Abb. 3.5:	Strukturformel von Ethanolamin	24
Abb. 3.6:	Vereinfachtes Schema der Wege zum Phosphatidylethanolamin und –cholin	25
Abb. 4.1:	Allgemeine Darstellung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von ssDNA-Aptameren	36
Abb. 4.2:	Aufbau der random DNA-Oligonukleotidbank (BANK-A bzw. BANK-B) mit verwendeten Primern.....	37
Abb. 4.3:	Epoxy- und Tosyl-Beads mit Reaktionsschema der Immobilisierung	38
Abb. 4.4:	Methoden zur Reinigung relevanter ssDNA aus PCR-Produkten.....	44
Abb. 4.5:	Vectorkarte von pCR2.1-TOPO mit Multicloning Site.....	45
Abb. 4.6:	Schema der Bindungsversuche mit immobilisiertem Target	50
Abb. 4.7:	Schema der Bindungsversuche mittels Affinitäts-Elution	52
Abb. 4.8:	IASys-Biosensor und Probenküvette, Querschnitt durch eine Küvette mit optischen Komponenten.....	53
Abb. 5.1:	Ergebnisse SELEX SS2	58
Abb. 5.2:	Quellverhalten von <i>Penicillium expansum</i> Sporen	59
Abb. 5.3:	Ergebnisse SELEX SS9	62
Abb. 5.4:	Ergebnisse SELEX SL6.....	64
Abb. 5.5:	Ergebnisse SELEX SL7	65
Abb. 5.6:	Ergebnisse SELEX SS9-L	67
Abb. 5.7:	Ergebnisse SELEX SP13	69
Abb. 5.8:	Aptamersequenzen.....	72
Abb. 5.9:	Sequenzalignments der Kernregion ausgewählter Aptamerklone	73
Abb. 5.10:	Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone.....	76
Abb. 5.11:	Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone.....	77
Abb. 5.12:	Übersicht über die Bindungsversuche gruppenspezifischer Aptamerklone mit Target-Beads (<i>Penicillium expansum</i>) bzw. Neagativ-Beads	78
Abb. 5.13:	Übersicht über die Bindungsversuche ausgewählter Aptamergruppen im IASys-Affinitätssensor.....	81
Abb. 5.14:	Bindung der löslichen Sporenfraktion und BSA an Aptamer #132 im IASys-Affinitätssensor.....	82
Abb. 5.15:	Bindungsversuche an ausgewählten Küvettenoberflächen im IASys-Affinitätssensor	83
Abb. 5.16:	Affinitätsreinigung von Proteinen aus der löslichen Sporenfraktion von <i>Penicillium expansum</i> mittels Aptameren	84
Abb. 5.17:	Ergebnisse SELEX SL1	87

Abb. 5.18:	Aptamersequenzen	89
Abb. 5.19:	Sequenzalignments der Kernregion ausgewählter Aptamerklone	90
Abb. 5.20:	Sequenzalignment der Kernregion ausgewählter Aptamerklone aus SELEX SL1	92
	und SP13	
Abb. 5.21:	Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone	94
Abb. 5.22:	Hypothetische Sekundärstruktur des Aptamers #137 aus SELEX SP13	95
Abb. 5.23:	Übersicht über die Bindungsversuche aller Einzelklone mit Ethanolamin-Beads.....	97
Abb. 5.24:	Nichtlineare Regressionsanalyse der aufgenommenen Sättigungskurven.....	99
Abb. 5.25:	Auswertung der aufgenommenen Sättigungskurven	98
Abb. 5.26:	Fluoreszenzwerte von Fluorescein-markierter ssDNA in Bindungspuffer mit unterschiedlichem pH-Wert	102
Abb. 5.27:	Affinitätselution mit frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin.....	103
Abb. 5.28:	Affinitätselution mit frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin bei variiertes Elutionszeit.....	104
Abb. 5.29:	Strukturformeln von Ethanolamin, Diethanolamin und Triethanolamin.....	104
Abb. 5.30:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu Ethanolamin-Derivaten	105
Abb. 5.31:	Strukturformeln von Ethanolamin, 4-Amino-1-Butanol und 4-Amino-1-Hexanol.....	106
Abb. 5.32:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 an Moleküle mit verlängerten C-Grundgerüst	106
Abb. 5.33:	Strukturformeln von Ethanolamin, Ethanol, Diethylamin und Triethylamin	107
Abb. 5.34:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 in Abhängigkeit des Vorhandenseins funktioneller Gruppen	107
Abb. 5.35:	Strukturformeln von Ethanolamin, 2-(Methylamino)-Ethanol und 2-Phenoxyethylamin	108
Abb. 5.36:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu strukturähnlichen Verbindungen	108
Abb. 5.37:	Strukturformeln von Ethanolamin, Phosphocolamin und CDP-Ethanolamin	109
Abb. 5.38:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 an phosphorylierte Ethanolamin-Verbindungen	109
Abb. 5.39:	Strukturformeln von Ethanolamin, Cholin und Serin	110
Abb. 5.40:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu funktionell ähnlichen Molekülen.....	110
Abb. 5.41:	Strukturformeln von Ethanolamin, Glycin, β -Alanin, Lysin und Arginin.....	111
Abb. 5.42:	Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu ausgewählten Aminosäuren	111
Abb. 6.1:	G-Tetrade und G-Quadruplexe	121
Abb. 6.2:	Hypothetische Quadruplexstruktur der Konsensussequenz	122
Abb. 6.3:	Design und Nachweismechanismen von Molecular Beacons und Signaling Aptamers	125
Abb. 6.4:	Bestimmung der Spezifität der Ethanolamin-Aptamere mittels Affinitätselution	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Beispiele für Zielmoleküle und dafür entwickelte Aptamere mit Angabe der Dissoziationskonstanten	10
Tab. 3.2:	Sporenbestandteile als mögliches Target im SELEX-Prozess.....	21
Tab. 4.1:	PCR-Komponenten und -Bedingungen während des SELEX-Prozesses	43
Tab. 4.2:	PCR-Komponenten und -Bedingungen für die Kolonie-PCR.....	47
Tab. 5.1:	Ergebnisse SELEX SS2	57
Tab. 5.2:	Ergebnisse SELEX SS9	61
Tab. 5.3:	Ergebnisse SELEX SL6.....	64
Tab. 5.4:	Ergebnisse SELEX SL7	65
Tab. 5.5:	Ergebnisse SELEX SS9-L	66
Tab. 5.6:	Ergebnisse SELEX SP13	69
Tab. 5.7:	Analyse der Basenzusammensetzung der Aptamer-Sequenzen.....	74
Tab. 5.8:	Übersicht über die Bindungsversuche gruppenspezifischer Aptamerklone mit Target-Beads (<i>P.expansum</i>)	79
Tab. 5.9:	Ergebnisse SELEX SL1	86
Tab. 5.10:	Übersicht über die Einteilung der Aptamere des SELEX SL1 in Haupt- und Untergruppen	90
Tab. 5.12:	Übersicht über die Bindungsversuche aller Einzelklone mit Ethanolamin-Beads	96
Tab. 5.13:	Überblick über die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten (K_D) und die maximale Anzahl der Bindungsstellen im Versuch (B_{max}).....	100
Tab. 5.14:	Übersicht der eingesetzten Substanzen für die Affinitätselutions-Versuche, deren Eigenfluoreszenz- und pH-Werte.....	101
Tab. 6.1:	Vergleich der Affinitätskonstanten unterschiedlicher Aptamere	124
Tab. 6.2:	Ausgewählte Aptamere mit Sequenzregionen ähnlich dem Konsensusmotiv der Ethanolamin-Aptamere	132

1 Einleitung

Durch den steigenden Bedarf an einfachen und schnellen analytischen Testverfahren in der klinischen Medizin, der Lebensmitteltechnologie, der Umweltanalytik, der Prozesskontrolle und der Biotechnologie, hat die Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Chemo- und Biosensorik in den letzten Jahren ein besonderes Interesse erlangt. Solche Sensoren sind preiswert und massenhaft herzustellen und vereinfachen die gewünschten Messungen.

Als Biosensoren bezeichnet man miniaturisierte Messfühler, die durch Transformation einer biologischen Messgröße in ein elektrisches oder optisches Signal, den Wert dieser Größe anzeigen. Sie bestehen aus drei Modulen:

- der stofferkennenden Schicht, die möglichst selektiv auf den Analyten ansprechen soll (Biorezeptor);
- dem Signalwandler (Transducer) zur Vermittlung des chemischen oder biologischen Signals und
- dem elektronischen Verstärker.

Das Herzstück eines jeden Biosensors ist die biologisch-aktive Komponente, der Biorezeptor. Traditionell werden als Biorezeptoren vor allem Enzyme und Antikörper eingesetzt. Darüber hinaus finden aber auch Zellen, Organellen oder natürlich vorkommenden Rezeptoren Anwendung. Neuere Entwicklungen zielen vor allem auf den Einsatz von speziell als Bindungspartner erzeugten Systemen, wie rekombinante Antikörper, Affibodies oder Synzyme. Ein deutlicher Trend ist auch in der Verwendung von Nukleinsäuren als biologische Erkennungselemente zu verzeichnen. Dazu gehören auch die so genannten Aptamere. Das sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere (ssDNA- oder RNA-Moleküle), die ein breites Spektrum an Analyten mit hoher Affinität und Spezifität erkennen und binden können. Die Bindung erfolgt dabei nicht über eine klassische Watson-Crick Basenpaarung, sondern aufgrund ihrer spezifischen dreidimensionalen Struktur. Dabei zeigen Aptamere im Vergleich zu Antikörpern, die ähnlich funktionieren, eine Reihe von Vorteilen. Einer der wichtigsten Aspekte ist die *in vitro* Selektionstechnik für die Gewinnung der Aptamere, die im Unterschied zur Antikörpererzeugung nicht auf den tierischen Organismus angewiesen ist. Dadurch können auch Aptamere für Targets entwickelt werden, für die die Antikörperherstellung problematisch ist, z.B. für Proteine, deren Struktur einem endogenen Protein zu stark ähnlich ist oder für Antigene mit toxischer Wirkung. Die Herstellung von Aptameren erfolgt in einem evolutiven Verfahren, dem so genannten SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Dabei werden aus einem großen Pool von Oligomeren mit variablen Sequenzabfolgen, die Oligonukleotide (Aptamere) herausgefiltert, die besonders gut an das Zielmolekül binden. Die Aptamerforschung ist ein relativ junges Gebiet, deren Schwerpunkt derzeit noch auf der Grundlagenforschung liegt. Es gilt Aptamere zunehmend auch in konkrete Anwendungen zu überführen. Ein besonders innovativer Ansatz dazu ist ihre Nutzung in Biosensoren.

2 Zielstellung

Die Entwicklung von Aptameren für einen Einsatz in Biosensoren steht im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit. Es soll gezeigt werden, dass der Einsatz von Aptameren für eine breite Auswahl an Zielmolekülen möglich ist. Daher sollen in einem Teil der Arbeit Aptamere für ein komplexes Target (Schimmelpilzsporen) entwickelt werden, während in einem anderen Teil die Aptamerselektion für ein besonders kleines, einfach strukturiertes Zielmolekül (Ethanolamin) im Vordergrund steht.

Im ersten Aufgabenteil wird versucht, Aptamere zu generieren, die für die Detektion von Schimmelpilzkontaminanten mit Hilfe von Biosensoren geeignet sind. Als Modellorganismen wurden *Penicillium expansum* und *Aspergillus versicolor*, zwei relevante Vertreter von Schimmelpilzkontaminationen in Innenräumen, ausgewählt. Zunächst sollten intakte Sporen als komplexes Target für die Aptamerselektion eingesetzt werden. Verschiedene Vorteile sprachen dafür:

- Vorteile:*
- in dieser Form in der Natur vorkommend,
 - gute Verfügbarkeit,
 - experimentell gut handhabbar,
 - auf Grund der Größe keine Immobilisierung im SELEX-Prozess notwendig.

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde jedoch festgestellt, dass eine Anreicherung spezifischer Oligonukleotide für intakte, unvorbehandelte Sporen nicht möglich war (*Kirsten, 2001; Stoltenburg & Strehlitz, 2003*). Die Ursachen werden in folgenden Gründen gesehen:

- Probleme:*
- Aufbau der äußeren Sporenhülle nicht bekannt,
 - Variabilität zwischen den einzelnen Sporenpräparationen,
 - spezieller Aufbau der Sporen als Überdauerungsorgane und die starke Hydrophobizität der äußeren Sporenhülle behindern die Bindung der Oligonukleotide im SELEX-Prozess.

Daher sollen in dieser Studie andere Wege gegangen werden. Zunächst soll die äußere Sporenhülle durch Quellung oder thermische Vorbehandlung aufgebrochen werden, um die darunter liegenden Strukturen für eine Aptamerselektion zugänglich zu machen. Als weitere Möglichkeit kann ein Sporenaufschluss und der Einsatz der frei werdenden löslichen Sporenfraktion als Selektionstarget erfolgen. Neben den genannten komplexen Zielstrukturen sollen definierte Sporenbestandteile, wie z.B. das β -1,3-Glucan der Sporenwand als Target im SELEX-Prozess eingesetzt werden.

Die Selektionen von Aptameren für die verschiedenen Schimmelpilz-relevanten Targets sollen auf der Methode des FluMag-SELEX-Prozesses basieren, welcher zunächst an das entsprechende Target hinsichtlich der Immobilisierungsmethode, der Bindungs- und Elutionsbedingungen angepasst werden muss.

Nach einer erfolgreichen Anreicherung von Target-spezifischen Oligonukleotiden werden diese mittels Klonierung vereinzelt, sequenziert und charakterisiert. Der Nachweis der Bindung der selektierten Aptamere zu den Sporenkomponenten ist dabei von besonderer Bedeutung. Hierzu sollen verschiedene Bindungsstudien durchgeführt werden. Der Einsatz der gewonnenen Aptamere in einem optischen Biosensorsystem (IASys-Affinitätssensor) wird angestrebt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen Aptamere für das besonders kleine und einfach strukturierte Target Ethanolamin selektiert werden. Ethanolamin ist nach Literaturrecherche (siehe Kap. 3.2.1) das bisher kleinste molekulare Aptamertarget. Neben der medizinisch-biologischen Bedeutung, die Ethanolamin zukommt (siehe Kap. 3.3.2), ist vor allem seine Funktion als Aptamer-Modellsystem von Bedeutung. Es soll mit Hilfe dieses Targets herausgefunden werden, ob eine Aptamere Selektion für solch ein kleines, einfach strukturiertes Molekül möglich ist und im positiven Fall, wie spezifisch und affin die Nukleinsäurerezeptoren ihr Zielmolekül erkennen. Durch den unkomplizierten Aufbau des Moleküls (zwei funktionelle Gruppen an einem C₂-Grundgerüst) ist es möglich, die an der Bindung im Target beteiligten Molekülgruppen genauer zu bestimmen. Hierzu sollen Bindungsversuche mit immobilisiertem und freiem Ethanolamin sowie strukturell oder funktionell verwandten Molekülen durchgeführt werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Biosensoren

3.1.1 Aufbau und Funktion

Der Begriff Biosensor wird für einen Aufbau verwendet, in dem eine selektiv erkennende biologische Komponente (Rezeptor) unmittelbar mit einem Signalwandler (Transducer) verbunden ist (Thévenot et al., 1999). Der Transducer wandelt das Signal aus der selektiven Erkennungsreaktion des Rezeptors, das der Konzentration des Analyten proportional ist, in ein elektrisch quantifizierbares Messsignal (Wilson, 1987). Der zu verwendende Transducer wird durch die Signalbildung des Rezeptors bestimmt. Die Signalbildung erfolgt auf Grund der molekularen Interaktion zwischen dem Analyten und den Rezeptormolekülen. Diese Interaktion bewirkt entweder die Änderung des Redoxzustandes der Rezeptorkomponente oder die Änderung der Konzentration einer elektrochemisch oder optisch aktiven Substanz. Dabei ändert sich die Konzentration aufgrund der Substanzbildung oder des Substanzverbrauchs durch den biologischen Rezeptor. Ebenso kann aber auch eine Änderung von Enthalpie, Masse oder Impedanz erfolgen. Je nach Art der Signalbildung werden elektrochemische, optische, thermische, impedimetrische oder piezoelektrische Transducer verwendet (Schmidt & Kittsteiner-Eberle, 1986). Eine angeschlossene Ausgabeelektronik ermöglicht die Dokumentation. (siehe Abb. 3.1)

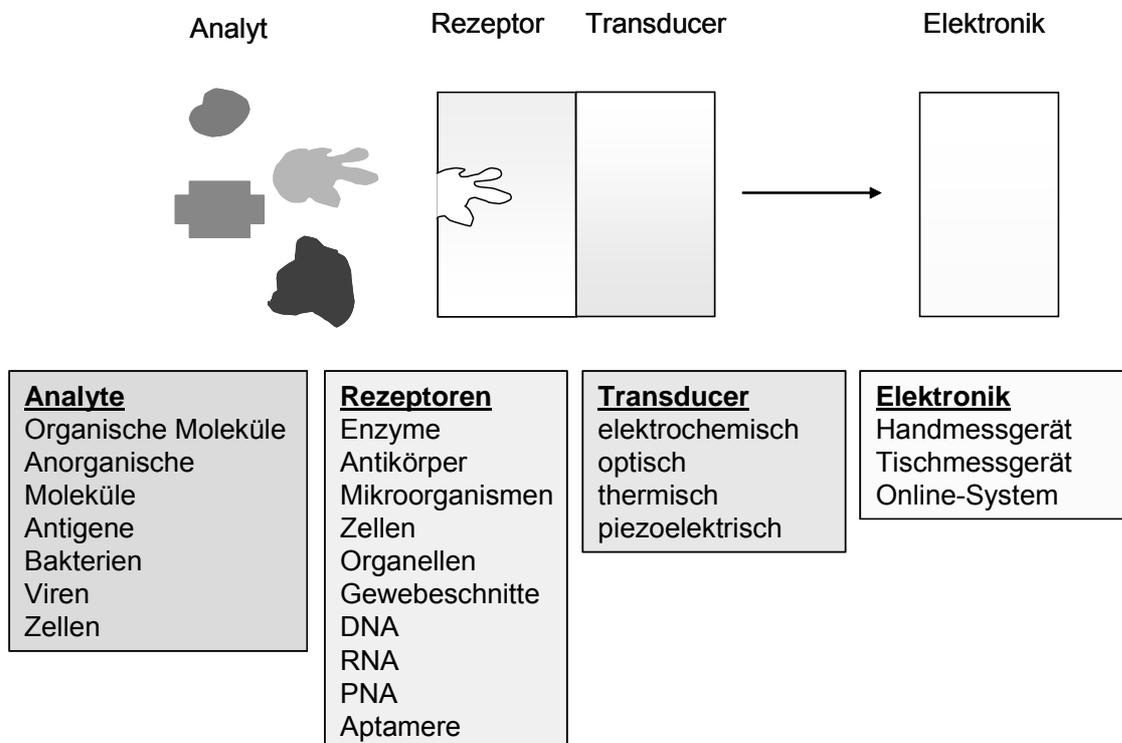


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau von Biosensoren

Im Idealfall verbrauchen Biosensoren keinerlei Reagenzien und es sind keine zusätzlichen Probenaufarbeitungsschritte nötig. Ein besonderes Merkmal der Biosensoren ist ihre Regenerierbarkeit und die daraus resultierende prinzipielle Wiederverwendbarkeit.

Mit der Verwendung des biologischen Elementes macht man sich die einzigartige Spezifität biologischer Moleküle für bestimmte Analyte zunutze. Aus einer Mischung gelöster Moleküle, die auch strukturell ähnlich sein können, kann der einzelne Analyt über die biospezifische Reaktion mit einem immobilisierten Biomolekül, wie z.B. einem Enzym, einem Antikörper oder einem Oligonukleotid, identifiziert werden. Die Spezifität des Biosensors wird also durch die biologische Komponente vorgegeben, während die Sensitivität vor allem durch den verwendeten Transducer beeinflusst wird.

Grundsätzlich sind Biosensoren in zwei Gruppen einteilbar (*Scheller et al., 1989*):

- *Enzym- oder Metabolismussensoren*
Die biologischen Komponenten dieser Sensoren metabolisieren den Analyten, wobei die Zu- oder Abnahme der Konzentration eines Reaktionspartners quantifiziert werden kann.
- *Affinitätssensoren*
Diese nutzen hochspezifische Affinitätspartner für die biomolekulare Erkennung des Analyten über eine Bindungsreaktion (wie z.B. Antikörper - Antigen oder Rezeptor - Ligand).

Die Reaktionen bei Affinitätssensoren sind sowohl durch Zunahme der molekularen Masse, als auch durch eine Vergrößerung des Volumens der biologischen Rezeptorschicht gekennzeichnet. In der Affinitätssensorik eignen sich besonders akustische und optische Messprinzipien.

3.1.2 Transducer

Damit die biologische Wechselwirkung messbar wird, sind physiko-chemische Parameter zu finden, die mit der biologischen Wechselwirkung korrelieren. Diese Transduktion erfolgt im Wesentlichen nach einem der vier Sensorprinzipien, die nachfolgend beschrieben werden.

- Thermische Transducer messen die thermischen Änderungen, die bei den meisten biologischen und chemischen Prozessen entstehen. Thermistoren mit Empfindlichkeiten von 10^{-5} bis 10^{-6} K sind üblich (*Ramanathan & Danielsson, 2001*). Der Großteil der thermischen Transducer nutzt Enzyme als biologische Erkennungselemente, aber auch Affinitätsreaktionen sind thermisch detektierbar.
- Elektrochemische Transducer nutzen den Elektronenfluss von oder zur Elektrode bei elektrochemisch aktiven Molekülen für die Quantifizierung. In der Amperometrie wird an der Messelektrode ein konstantes Potenzial in Bezug zu einer Referenzelektrode angelegt. Gemessen wird der resultierende Strom zwischen der Mess- und einer Gegenelektrode, welcher abhängig ist von der durch die Polarisierungsspannung verursachten Reduktion oder Oxidation der zu bestimmenden Moleküle in Lösung. In der Voltammetrie variiert dieses Potenzial in einer spezifischen Form (Zyklische Voltammetrie, Linear Sweep Voltammetrie, Stair Case Voltammetrie) und der

resultierende Strom wird als eine typische Welle aufgezeichnet. Potentiometrische Sensoren verwenden als Messgröße die Potentialdifferenz zwischen einer Mess- und einer Referenzelektrode, die durch die Aktivitätsänderung des Analyten an der Elektrode hervorgerufen wird. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung konduktometrischer Transducer. Hierbei wird die Leitfähigkeit eines Sensormaterials zur Signalbildung genutzt. Die detektierten Leitfähigkeitsänderungen werden verursacht durch die Änderungen der Ionen- bzw. Molekülkonzentrationen eines zu messenden Gases oder einer Lösung. Die elektrochemische Transduktion wird meist für Enzym- oder Metabolismussensoren eingesetzt (Cass, 1990; Hamann et al., 1998).

- Die akustischen Detektionsverfahren nutzen die Frequenzänderungen eines piezoelektrischen Schwingquarzes, der Masseänderungen hochempfindlich nachweist. Der verwendete Quarzkristall wird in einem oszillierenden elektrischen Feld platziert und die Resonanzfrequenz des Kristalls gemessen. Eine Masseänderung auf der Oberfläche des Schwingquarzes, z.B. durch Reaktion des Analyten mit dem vorher auf der Kristalloberfläche immobilisierten Rezeptor, bewirkt eine Änderung der Resonanzfrequenz, welche quantifiziert werden kann (O'Sullivan, 1999).
- Die optische Detektion beruht auf dem Nachweis von Energieübergängen. Zu den optischen Methoden zählen die Messung von Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Biolumineszenz und Chemolumineszenz, Infrarotübergängen und Lichtstreuung (partikelgrößenabhängig), aber auch der Interferenz an dünnen Schichten (reflektrometrische Interferenzspektroskopie) sowie der Oberflächenplasmonresonanz. Eine sehr gute Übersicht über optische Biosensoren und deren Arbeitsprinzipien findet sich in der Arbeit von Akkoyun (Akkoyun, 2002).

Resonant Mirror Spektroskopie

In dieser Arbeit kommt die Resonant Mirror Technologie zum Einsatz, ein mit der Plasmonresonanz verwandtes optisches Messprinzip, (Buckle et al., 1993, Cush et al., 1993). Das Messprinzip ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

Polarisiertes Licht aus einem Diodenlaser gelangt durch einen Quarzblock an eine optisch dünne Kopplungsschicht und wird hier total reflektiert. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer absoluten Reflektion, sondern das elektromagnetische Feld setzt sich (exponentiell schwächer werdend) als so genanntes evaneszentes Feld in der optischen Kopplungsschicht fort. Durch diesen Effekt gelangt Licht in die darüber liegende optische Schicht, genannt Wellenleiter. Diese ist wiederum optisch dichter als die Kopplungsschicht. Dadurch findet auch hier Totalreflektion statt und ein evaneszentes Feld baut sich auf. Der reflektierte Teil des Lichtes gelangt so wieder zurück zum Quarzblock. Dieses Licht ist durch den beschriebenen Vorgang im Vergleich zum eingestrahltten Licht um 90° gedreht, so dass es unter Verwendung eines zweiten Polarisationsfilters detektiert werden kann.

Der Winkel der Totalreflektion ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Bei konstantem Versuchsaufbau kann die Änderung des Brechungsindex in einer Region etwa 250 nm oberhalb des Wellenleiters detektiert werden. Diese Region heißt Sensorschicht und ihre Größe wird von der Reichweite des evaneszenten Feldes bestimmt. Bindet nun ein Ligand an einen zuvor an den Wellenleiter immobilisierten Rezeptor, ändert sich der Brechungs-

index und es kommt zu einem veränderten Resonanzwinkel. Je größer dabei die gebundene Masse ist, desto größer ist auch die Änderung des Resonanzwinkels. Gemessen wird in Winkelsekunden (arc sec).

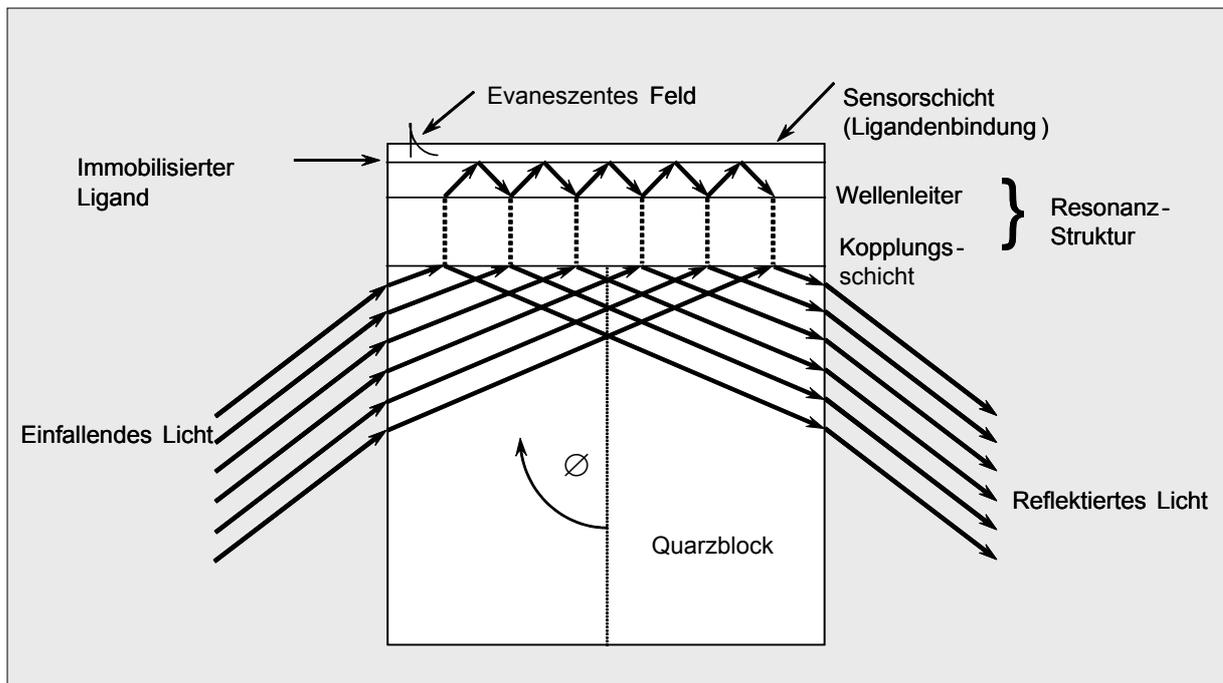


Abb. 3.2: Prinzip der Resonant Mirror Spektroskopie (aus der Präsentation: IAsys Biosensor Training 2001, Affinity-Sensors)

3.1.3 Biorezeptoren

In Biosensoren werden verschiedenste Erkennungselemente, so genannte Biorezeptoren, eingesetzt. Neben traditionellen Systemen wie Enzymen, Antikörpern, Zellen, Organellen oder natürlich vorkommenden Rezeptoren (z.B. Käferfühler; *Schöning et al., 1998*) gibt es neuere Entwicklungen, von denen einige wichtige im Folgenden kurz erwähnt werden sollen. Es zeigt sich in den letzten Jahren ein deutlicher Trend, nicht nur natürlich vorkommende Strukturen einzusetzen, sondern zielgerichtet neuartige Binde- bzw. Reaktionspartner zu erzeugen. Der Begriff „biologische Erkennungssysteme“ wird dabei in der Literatur auch auf solche artifiziellen Systeme ausgedehnt.

Eine bedeutsame Entwicklung sind rekombinante Antikörper. Hier sind vor allem die monovalenten Fragmente Fab' und scFv sowie bivalente bzw. bispezifische Fragmente wie Diabodies zu nennen. Fab'-Fragmente entsprechen dabei dem IgG-Antikörper ohne den für verschiedene Effektorfunktionen verantwortlichen konstanten Fc-Teil; scFv-Fragmente sind die mit einer Peptid- statt einer Disulfidbrücke verknüpften beiden variablen Abschnitte eines IgG-Moleküls. Bivalente bzw. bispezifische Antikörper wie Diamere entstehen z.B. aus der Fusion gleich spezifischer bzw. verschieden spezifischer scFv-Fragmente (*Hudson, 1999*).

Eine andere Entwicklung stellen Anticaline dar. Das sind Lipocalinvarianten, bei denen die Bindedomäne so verändert wurde, dass sie völlig andere Zielstrukturen binden können. Lipocaline bilden eine natürlich vorkommende Proteinfamilie, deren Hauptaufgabe es ist, bestimmte hydrophobe, kleine Moleküle zu binden (*Weiss & Lowmann, 2000*).

Prinzipiell ähnlich sind Affibodies. Sie unterscheiden sich aber von den Anticalinen hinsichtlich des zugrunde liegenden Proteins, z.B. Nutzung der alpha-helikalen bakteriellen Rezeptordomäne Z (Nord *et al.*, 1997) oder dem Gamma-II-Kristallin, ein Strukturprotein des Auges (Ebersbach, 2004).

Alle diese Strukturen bestehen aus Aminosäuren. Sie werden mittels evolutionärer Strategien hergestellt, die teilweise (Phage-Display, Schmitz *et al.*, 2000) oder vollständig (Ribosom-Display, Hanes *et al.*, 1998; Polysome-Display Fitzgerald, 2000) *in vitro* durchgeführt werden.

Die Erkennung von Nukleinsäuresequenzen basierend auf komplementärer Hybridisierung von Nukleinsäuren ist mit DNA, RNA oder PNA möglich. PNA steht für Peptid Nucleic Acid und ist ein DNA-Analogon, dessen chemisches Rückgrat statt eines Zuckers ein Pseudo-peptid enthält (Crooke, 1992).

In jüngster Zeit werden in Biosensoren auch Aptamere als biologische Erkennungselemente eingesetzt (O'Sullivan, 2002). Das sind Nukleinsäuren, deren Bindung mit dem Analyten nicht über eine klassische Watson-Crick Basenpaarung erfolgt, sondern aufgrund ihrer spezifischen dreidimensionalen Struktur. Da sie im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, wird im nächsten Abschnitt auf sie besonders eingegangen.

Schließlich seien noch Molecular Imprints und Synzyme erwähnt. Synzyme sind künstliche Enzyme, die ihre Substrate erkennen (Ho & Rechnitz, 1987). Molecular Imprints bestehen dagegen z.B. aus hochvernetzten Polymeren (z.B. Polyurethanen) oder Cyclodextrinen, in die mittels Imprint-Verfahren Bindungsstellen für einen Liganden eingearbeitet werden. Obwohl die entsprechenden Sensoren genau genommen in die Gruppe der Chemosensoren gehören, werden sie wegen vieler wichtiger Anwendungen im biologischen Bereich oft fälschlicherweise zu den Biosensoren gerechnet (Dickert *et al.*, 2000).

3.2 Aptamere

3.2.1 Struktur und Funktionsweise

Der Begriff „Aptamer“ leitet sich vom lateinischen „aptus“ (= passend) und dem griechischen „meros“ (= Teil) ab. Eingeführt wurde diese Bezeichnung von Ellington und Szostak (Ellington & Szostak, 1990).

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere (ssDNA- oder RNA-Moleküle), die sich durch die Ausbildung einer spezifischen, komplexen dreidimensionalen Struktur auszeichnen. Diese Struktur befähigt Aptamere, analog einer Antigen-Antikörper-Bindung, „passgenau“ nukleinsäurefremde Liganden zu binden (siehe Abb. 3.3).

Die dreidimensionale Struktur entsteht unter anderem in Folge von intramolekularen Basenpaarungen nach Watson und Crick. Aber auch „Nicht-Watson-Crick“ Basenpaarungen, Basenstapelungen sowie Pseudoknoten, „kissing“-Komplexe, parallele oder antiparallele Triplexe und Guanin-Quadruplexe kommen vor (Gilbert & Feigon, 1999; Li & Breaker, 1999). Die Aptamere scheinen ihre Zielmoleküle mit Hilfe eines „induced fit“-Mechanismus zu binden. Das bedeutet, das Aptamer verändert seine Struktur in Gegenwart des Targets so, dass es zur Bindung befähigt ist. Möglich ist auch, dass das Target seine Gestalt in gewisser Weise variiert, um mit dem Aptamer eine Bindung einzugehen (Williamson, 2000).

Eine andere Theorie besagt, dass die Oligonukleotide in ihrer dreidimensionalen Struktur recht stabil sein können. Die Einlagerung von bivalenten Kationen mit der Fähigkeit Guaninbasen und Phosphatgruppen miteinander zu verknüpfen, verleiht nach Meinung der Autoren (*Blank, 2002*) dem Aptamer einen hohen Grad an molekularer Starrheit und somit die Fähigkeit, das jeweilige Zielmolekül mit hoher Genauigkeit zu erkennen und mit großer Affinität und Spezifität zu binden.

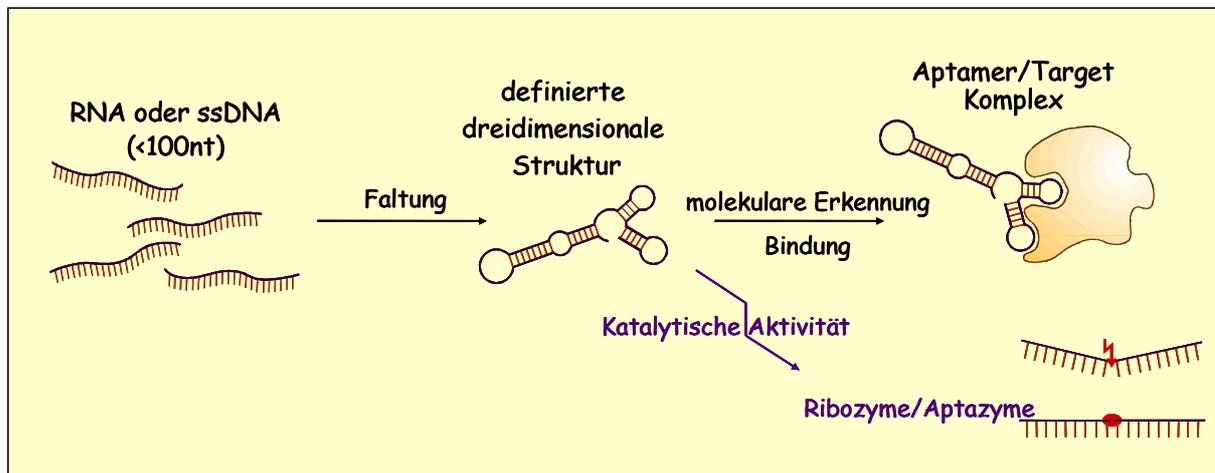


Abb. 3.3: Funktionsweise von Aptameren (nach Stoltenburg & Strehlitz, 2003)

Die eigentliche Aptamer-Target-Bindung erfolgt über die Strukturkompatibilität, so genannte „Stacking Interactions“ bei aromatischen Ringstrukturen (Stapelkräfte durch Elektronenwechselwirkung mit den Nachbarbasen), elektrostatische Wechselwirkungen (z.B. Van der Waals-, Ionen-, Dipolkräfte) und Wasserstoffbrückenbindungen (*Hermann & Patel, 2000; Hermann, 2000*).

Die ersten entwickelten Aptamere bestanden aus unmodifizierter RNA (*Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990*). Später wurden auch Aptamere aus einzelsträngiger DNA (*Jayasena, 1999*) realisiert und doppelsträngiges PCR-Produkt (*Bruno, 1997*) als Aptamer beschrieben. Ebenso kamen chemisch modifizierte Nucleinsäuren zum Einsatz (*Green et al., 1995*). Dabei zeigten sich im Bindungsverhalten keine prinzipiellen Unterschiede zwischen DNA, RNA und modifizierter RNA, wohl aber im Stabilitätsgewinn durch die Verwendung modifizierter Nucleinsäuren (*Gold et al., 1995*). Die Affinitäten der Aptamere liegen in der Regel im mikro- bis picomolaren Bereich (*Famulok & Mayer, 1999; Tombelli et al., 2005*).

Besitzen Aptamere katalytische Aktivität, werden sie Aptazyme genannt (siehe Kap. 3.2.3). Die Molekülklassen, für die bisher erfolgreich Aptamere generiert wurden, sind sehr vielfältig. So wurden Aptamerentwicklungen beschrieben für Atome und kleine Moleküle, für Aminosäuren, Peptide, Polysaccharide und Proteine, aber auch für komplexe Strukturen wie Viren und einzellige Organismen. Dabei können sowohl Aptamere für nucleinsäurebindende Liganden (z.B. Polymerasen, *Tuerk & Gold, 1990*) als auch für Liganden, die natürlicherweise nicht mit Nucleinsäuren assoziiert sind (z.B. Wachstumsfaktoren, *Jellinek et al., 1993*; Antikörper, *Tsai et al., 1992* oder Hormone, *Lin et al., 1996*) selektiert werden. Eine Auswahl von Zielmolekülen und dafür entwickelte Aptamere ist in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

3.2 Aptamere

Tab. 3.1: Beispiele für Zielmoleküle und dafür entwickelte Aptamere mit Angabe der Dissoziationskonstanten

Zielmolekülgruppe	Selektionstarget	Aptamer	K_D	Literaturangabe
Metallionen	Nickel	RNA	1 μ M	(Hofmann et al., 1997)
Nukleotide	Flavinmononukleotid (FMN)	RNA	500 nM	(Burgstaller & Famulok, 1994)
	Adenosintriphosphat (ATP)	DNA	6 μ M	(Huizenga & Szostak, 1995)
Aminosäuren	Arginin	DNA	125 μ M	(Harada & Frankel, 1995)
	Citrullin	RNA	65 μ M	(Famulok, 1994)
Aminoglykoside	Tobramycin	RNA	12 nM	(Wang & Rando, 1995)
	Neomycin	RNA	115 nM	(Wallis et al., 1995)
Peptide	Rev-Peptid	RNA	20 nM	(Xu & Ellington, 1996)
	Vasopressin	L-DNA	900 nM	(Williams et al., 1997)
Proteine	HIV 1-Rev	RNA	1 nM	(Giver et al., 1993)
	Human Thrombin	DNA	25 nM	(Bock et al., 1992)
	Receptor tyrosine kinase (RET)	2' mod RNA	35 nM	(Cerchia et al., 2005)
	Vascular Endothelial Grow Factor (VEGF)	2' mod RNA	0,14 nM	(Green et al., 1995)
	Monoklonaler Antikörper anti-MUC1	DNA	200 nM	(Missailidis et al., 2005)
Monosaccharide	Galaktose	RNA	10 μ M	(Kawakami et al., 1998)
Polysaccharide	Dextran (Sephadex)	RNA	n.b.	(Srisawat et al., 2001)
	Zellulose	DNA	300 nM	(Yang et al., 1998)
Komplexe Strukturen	Trypanosomen	RNA	60 nM	(Homann & Goringe, 1999)
	Rous Sarcoma Virus	2' mod RNA	>40 nM	(Pan et al., 1995)
	Anthrax-Sporen	DNA	n.b.	(Bruno & Kiel, 1999)
	Hirntumor-Endothelzellen	DNA	n.b.	(Blank et al., 2001)

3.2.2 Eigenschaften von Aptameren

Die Detektion und Quantifizierung von Molekülen spielt eine wichtige Rolle in Naturwissenschaft und Medizin. Zunehmend sind empfindlichere Nachweismethoden gefragt, womit der Bedarf an selektiveren und sensitiveren Erkennungsmodulen verknüpft ist. Aptamere weisen eine hohe Affinität und Spezifität auf, die vergleichbar mit Antikörpern sind. Sie können zwischen eng verwandten Targets unterscheiden, wenn ihre Selektion für ein bestimmtes Epitop des Targets erfolgt (z.B. Unterscheidung zwischen Theophyllin und Coffein; *Jenison et al., 1994*, siehe auch Kap. 3.2.4.2). Auch die Unterscheidung von chiralen Molekülen (Enantiomeren) ist möglich (*Michaud et al., 2003*).

Die *in vitro* Herstellung der Aptamere kommt aber im Gegensatz zur klassischen Antikörperherstellung ohne Tierversuche oder Zellkulturen aus. Neben ethischen Gründen hat das den Vorteil, Aptamere auch für toxische oder weniger immunogene Zielstrukturen unter nicht physiologischen Bedingungen anreichern zu können. Zudem lassen sich Aptamere während ihrer Entwicklungsphase (*in vitro* Selektion) bereits hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften gezielt an eine spätere Applikation anpassen. Im Gegensatz dazu sind diese Parameter bisher in der klassischen Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybridomzelllinien nicht steuerbar (*Jayasena, 1999*). Das Beispiel des *Taq*-Polymerase-Aptamers kann diese Aussage verdeutlichen (*Dang & Jayasena, 1996; Lin & Jayasena, 1997*). Das Aptamer inhibiert die Polymerase bei Temperaturen unter 40 °C und ermöglicht damit die spezifische Vervielfältigung schwer amplifizierbarer DNA-Sequenzen. Ein monoklonaler Antikörper, der die Aktivität der Polymerase bei niedrigen Temperaturen inhibieren sollte, wurde im Gegensatz zu den untersuchten Aptameren im Verlauf der PCR durch die zyklisch auftretenden Temperaturerhöhungen denaturiert.

Aptamere sind, sobald ihre Sequenz analysiert wurde, jederzeit mit einem hohen Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit chemisch synthetisierbar. Sie werden unter stringenten, denaturierenden Bedingungen gereinigt und überzeugen daher durch einen hohen Reinheitsgehalt. Aus diesem Grund wird bei der Aptamerproduktion keine Variation zwischen den einzelnen Chargen erwartet (*Kawazoe et al., 1996*).

Reporter- und Adaptermoleküle, wie beispielsweise Fluorescein oder Biotin, können während der Synthese punktgenau an definierten Stellen des Aptamers angebracht werden. Die Erkennung der Zielstruktur ist häufig von relativ einfachen Sekundär- oder Tertiärstrukturmotiven innerhalb des Aptamers ableitbar. Das ermöglicht eine nachträgliche Modifizierung der Aptamere hinsichtlich ihrer Größe, Temperaturstabilität oder enzymatischem Verdau (*Green et al., 1995; Eaton et al., 1997*).

Die Denaturierung von Aptameren und die Aptamer-Target-Bindung sind reversibel. Letzteres ist eine wichtige Eigenschaft, die sie für einen Einsatz in Biosensoren geeignet macht.

Trotz der viel versprechenden Aussichten steckt die Aptamerforschung noch in den Anfängen. Ein Nachteil ist die Tatsache, dass derzeit kein standardisiertes Protokoll zur Herstellung der Aptamere zur Verfügung steht, welches ohne spezifische Modifikationen für die verschiedensten Targets angewendet werden kann. Die Forschung an Aptameren holt aber in großen Schritten auf. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Aptamere ihre Anwendung in naher Zukunft auch in standardisierten diagnostischen Tests finden werden. Die großen Märkte der Immundiagnostik im medizinischen Bereich lassen einen zunehmenden

Wettkampf zwischen Antikörper- und Aptamer-basierenden Test-Kits erwarten. Einige Arbeitsgruppen haben zudem begonnen, mit Antikörpern arbeitende diagnostische Plattformen auf Aptamere zu übertragen (*Blank, 2002*). Ein Beispiel dafür ist der auf der ELISA-Technologie basierende ELONA (Enzyme Linked OligoNucleotide Assay), bei dem statt mit monoklonalen Antikörpern, mit Aptameren gearbeitet wird (*Drolet et al., 1996*).

3.2.3 Einsatz von Aptameren

Das Anwendungsspektrum der Aptamere ist sehr breit gefächert. So gibt es Anwendungspotentiale in der medizinisch-pharmazeutischen Grundlagenforschung und auf Gebieten der klinischen Diagnostik und Therapie (z.B. Inhibition von Enzymaktivitäten oder Blockierung von Rezeptorbindungsstellen) (*Klug et al., 1999; Hermann & Patel, 2000; Thiel, 2004*). Das erste therapeutisch eingesetzte Aptamer ist anti-human VEGF-Aptamer (VEGF: vascular endothelial grow factor) (*Tucker et al., 1999*). Auf Grundlage dieses Aptamers wurde der Wirkstoff Pegaptanib entwickelt, der seit kurzem (in Europa seit Anfang 2006, in den USA seit Ende 2004) als Medikament Macugen® (Pfizer Inc.) zugelassen und auf dem Markt ist. Aptamere werden aber auch als molekulare Erkennungswerkzeuge in analytischen Systemen eingesetzt (*Clark & Remcho, 2002*). Beispiele zum Einsatz von Aptameren in der Affinitätschromatographie (*Deng et al., 2001*), Affinitätskapillarelektrophorese (*German et al., 1998; Connor & McGown, 2006*), Kapillarelektrochromatographie (*Kotia et al., 2000*) und Flowzytometrie (*Davis et al., 1998*) wurden bereits beschrieben. Aber sie werden in Zukunft auch eine zunehmende Rolle als neuartige Biorezeptoren in Biosensoren spielen (*O'Sullivan, 2002*). In der Literatur finden sich bereits einige Beispiele von Aptamerapplikationen in Biosensoren mit zumeist optischer Detektion der Bindungsreaktion. Als Rezeptorkomponenten wurden z.B. ein anti-Thrombin-Aptamer, sowie ein L-Adenosin-Aptamer eingesetzt (*Kleinjung et al., 1998; Lee & Walt, 2000; Potyrailo et al., 1998*). Eine weitere Biosensorentwicklung basiert auf Aptameren für humanes IgE und der Quarzkristall-Mikrowaage als Detektionsprinzip (*Liss et al., 2002*). Eine auch für Biosensoren interessante Perspektive zur Nutzung von Nukleinsäuren stellen die katalytisch aktiven Nukleinsäuren, Ribozyme oder Desoxyribozyme mit zumeist Nuklease- oder Ligaseaktivität, dar (*Soukup & Breaker, 2000*). Als Beispiel dafür sind die so genannten Aptazyme zu nennen, welche allosterische Eigenschaften (Regulierung der katalytischen Aktivität durch einen Effektor) besitzen. Es handelt sich hierbei um eine Kombination aus Aptamer und katalytisch aktiver Nukleinsäure (*Famulok, 2005*). Das Besondere dabei ist, dass die Strukturänderung im Nukleinsäurekonstrukt, bedingt durch die spezifische Aptamer-Target-Bindung, zu einer Aktivierung oder Inhibition der katalytischen Eigenschaft der Ribozymkomponente führt. Die katalytische Aktivität (z.B. Nukleaseaktivität) kann hierbei durch das An- bzw. Ausschalten eines Fluoreszenzsignals sichtbar gemacht werden (*Rajendran & Ellington, 2002; Lu, 2002*).

3.2.4 *in vitro* Selektion zur Gewinnung von Aptameren

3.2.4.1 Prinzip

Zur Gewinnung von Aptameren wird eine *in vitro* Selektions- und Amplifikations-Technik eingesetzt, die auch als SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) bezeichnet wird (auch *in vitro* Selektion oder *in vitro* Evolution). Sie wurde

zeitgleich und unabhängig voneinander in den Laboratorien von J.W. Szostak (*Ellington & Szostak, 1990*) und L. Gold (*Tuerk & Gold, 1990*) entwickelt. Beide Ansätze basieren auf dem Prinzip der selektiven Erkennung von Zielstrukturen, vermittelt durch die dreidimensionale Form von einzelsträngigen Nucleinsäuren.

Grundlage dieser „Evolution im Reagenzglas“ ist das Darwinsche Prinzip:

- Erzeugung einer Sequenzvielfalt → Mutation,
- Selektion bestimmter phänotypischer Eigenschaften → Auslese,
- Amplifikation der selektierten Moleküle → Vermehrung.

Ausgangspunkt des Prozesses ist eine kombinatorische Zufallsbibliothek, bestehend aus einzelsträngigen Nucleinsäuren (RNA, ssDNA oder modifizierte Nucleinsäuremoleküle). Gewöhnlicherweise werden ca. 10^{15} verschiedene Moleküle eingesetzt (*Gold et al., 1995*). Diese Zahl übersteigt die Varianten des Immunsystems um das 10^7 fache (*Janeway, 1993*) und die Variationsbreite typischer chemischer Bibliotheken um einen Faktor von 10^{10} (*Eaton et al., 1997*). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass für nahezu jedes gewünschte Target auch mindestens ein möglicher Bindungspartner (Aptamer) selektiert werden kann. Zur Anreicherung genau dieser Strukturen wird die Oligonucleotid-Bibliothek einem geeigneten Selektionsprozess in Gegenwart des Zielmoleküls unterzogen, in welchem funktionelle von nicht funktionellen Nucleinsäuren abgetrennt werden. Die mit dem Zielmolekül interagierenden Aptamere werden anschließend vervielfältigt und wiederholten Selektionszyklen unterzogen. Dies ist erforderlich, da die Komplexität der Bibliothek eine Anreicherung bindender Nucleinsäuren in einem einzigen Selektions- und Amplifikationsschritt nicht zulässt. Es werden daher mehrere Zyklen iterativ durchlaufen, bis die funktionellen Sequenzen im Oligonucleotidpool dominieren. Diese können dann mittels Klonierung vereinzelt, sequenziert und charakterisiert werden (*Klug & Famulok, 1994*).

Abbildung 3.4 zeigt den prinzipiellen Ablauf eines SELEX-Prozesses.

SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment)

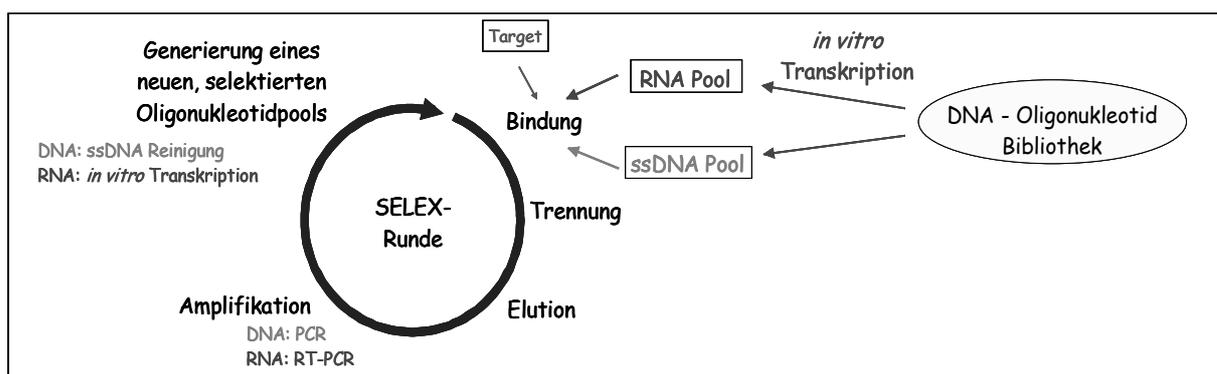


Abb. 3.4: Prinzip des SELEX

Im Vergleich untereinander haben sowohl die RNA- als auch die DNA-SELEX-Prozedur Vor- und Nachteile. Der entscheidende Unterschied im Prozess ist, dass beim RNA-SELEX die synthetische ssDNA-Oligonucleotid-Bibliothek als Transkriptionsschablone zur Herstellung einer RNA-Bibliothek dient. Die Nutzung eines zur Bibliothek komplementären 5'-Primers, welcher zusätzlich einen T7 Promotor enthält, führt in einer *in vitro* Transkription mittels T7

RNA Polymerase zum Erhalt der entsprechenden RNA-Bibliothek. In jeder SELEX-Runde werden dann die selektierten RNA-Oligonukleotide zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert (RT-PCR). Aus den entstehenden PCR-Produkten wird wiederum mittels *in vitro* Transkription ein neuer RNA-Pool für die nächste Runde generiert.

Im Gegensatz dazu kann bei der Selektion von DNA-Aptameren die ssDNA-Oligonukleotid-Bibliothek direkt im SELEX eingesetzt werden. Im Anschluss an die Selektions- und Amplifikationsschritte erfolgt hier die Generierung des neuen, selektierten DNA-Oligonukleotidpools für die nächste Runde über die Reinigung der relevanten Einzelstränge aus den doppelsträngigen PCR-Produkten. Neben diesen Unterschieden im Prozess differieren RNA- und DNA-Moleküle im Wesentlichen durch ihre unterschiedliche Beständigkeit gegenüber enzymatischem Verdau und im Grad ihrer Modifizierbarkeit. Die Stabilität gegenüber Endonukleasen ist bei natürlicher RNA geringer als bei DNA. Modifizierte RNA (z.B. mit 2'-Fluoro-, 2'-Amino- oder 2'-O-Methyl-Modifikationen) und DNA (Einsatz von L-Isomeren) sind diesbezüglich am stabilsten (*Gold et al., 1995; Williams et al., 1997; James, 2000*). DNA hat im Vergleich mit RNA den entscheidenden Vorteil, dass mittels PCR sehr einfach Modifikationen vorgenommen werden können. Reportermoleküle zur Detektion (z.B. Fluorophore) oder funktionelle Gruppen bzw. Moleküle für eine Immobilisierung oder Einzelstrangauffrennung (z.B. Amino-, Phosphat-, Thiol-Gruppen, Spacer, Biotin) sind so direkt einbaubar. Beim RNA-SELEX-Prozess ist die Möglichkeit des Einbaus entsprechender Moleküle an vordefinierter Stelle nicht möglich (*Conrad & Ellington, 1996*).

Die Durchführung der Selektion unter direkter Einbeziehung des Zielmoleküls für den Bindungsschritt mit den Oligonukleotiden ist ein sehr praxisbezogener Ansatz. Von Vorteil dabei ist, dass für die Selektion keine detaillierten Kenntnisse über das Target nötig sind. Üblicherweise werden zwar im SELEX einzelne, definierte Targets eingesetzt, aber eine Aptamergewinnung ist auch für komplexe und unbekannte Strukturen möglich (siehe Kap. 3.2.1). Prinzipiell dürfte es sogar möglich sein, über den Weg der Aptamers Selektion Informationen über das Target zu bekommen. So ist es vorstellbar, über die Kenntnis der gewonnenen Aptamere auf bestimmte Bestandteile des Targets schließen zu können.

Einer der entscheidenden Schritte für eine erfolgreiche Selektion im SELEX-Prozess ist die konsequente Trennung der Target-bindenden von den nicht bindenden Oligonukleotiden. Als konventionelle Methode dafür kommt häufig die Affinitätschromatographie zum Einsatz, wobei üblicherweise das Target auf Säulenmaterialien, wie Sepharose oder Agarose, immobilisiert wird (*Tombelli et al., 2005*). Hierfür sind allerdings substantielle Mengen an Target nötig, um eine ausreichend hohe Beladung der Säulen zu erzielen.

Als eine andere Art der Separation wird die Methode der Filtration (z.B. mit Nitrozellulosefiltern) genutzt. Hierbei handelt es sich um die Ultrafiltration mit einer bestimmten Ausschlussgrenze. Dabei sind unspezifische Bindungen an die Membran und damit verbundene Verluste bzw. unspezifische Anreicherungen möglich.

Eine weitere Möglichkeit der Trennung besteht in der Verwendung von Magnetic Beads. Dabei handelt es sich um paramagnetische Polystyren-Beads mit einem Eisengehalt von 12-15 %. Im Gegensatz zu den vorgenannten Methoden erfordert eine Immobilisierung des Targets auf magnetische Beads nur sehr geringe Mengen an entsprechendem Zielmolekül und ermöglicht zudem eine einfache Handhabung. Das Arbeiten mit der magnetischen Separationstechnologie ist schneller, einfacher und effektiver, die Trennung ist effizienter

und stringentere Waschschritte sind möglich (Stoltenburg *et al.*, 2005). Zudem ist mit dieser Immobilisierungs- und Separationsmethode das Potenzial zur parallelen Durchführung von SELEX-Prozessen, sowohl „per Hand“ als auch automatisiert, gegeben. Magnetic Beads werden mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen (z.B. Epoxy-, Tosyl-, Biotin-, Amino-, Carboxyl- oder Antikörperbeschichtungen) angeboten. Auf Grund dieser mannigfachen Funktionalisierungen lassen sich die verschiedensten Targets immobilisieren. So sind Magnetic Beads für Peptide, Proteine, Antigene und Antikörper ebenso einsetzbar, wie für Nukleinsäuren, Kohlehydrate und andere Moleküle (Safarik & Safarikova, 2004).

3.2.4.2 SELEX-Varianten

Ein Vorteil der SELEX-Prozedur sind die vielen Möglichkeiten, den Prozess schon während der Selektion den erforderlichen Bedingungen anzupassen. So entwickelten Autoren in den letzten Jahren unzählige Varianten des ursprünglich von Tuerk & Gold (Tuerk & Gold, 1990) eingeführten Verfahrens. An dieser Stelle soll nur ein grober Überblick über häufig angewendete SELEX-Arten gegeben werden.

- Der Counter-SELEX ist eine Methode, um Aptamere zu generieren die zwischen verwandten Strukturen unterscheiden können. Hierbei wird zur Eliminierung von Aptameren aus dem Oligonukleotidpool, welche zur Differenzierung zwischen ähnlichen Zielmolekülen nicht in der Lage sind, ein Selektionsschritt zum verwandten Target eingeführt. Eines der beeindruckendsten Beispiele dafür ist das Theophyllin-Aptamer. Der SELEX-Prozess wurde von Jenison *et al.* (Jenison *et al.*, 1994) so gestaltet, dass die selektierten Nukleinsäurerezeptoren ihr Zielmolekül Theophyllin etwa 10000fach besser binden können als das strukturverwandte Koffein, welches sich nur durch eine Methylgruppe am Stickstoff N-7 des Purinringes unterscheidet.
- Ein Negativ-SELEX wird oft vorgeschaltet, um die Koselektion unerwünschter Oligonukleotide zu minimieren. Dazu werden die Nukleinsäuren vor der eigentlichen Bindungsreaktion mit Strukturen inkubiert, die nicht erkannt werden sollen. Dadurch werden die Oligonukleotide aus dem Pool entfernt, die an diese unerwünschten Strukturen binden. Blank (Blank, 2002) unterdrückte in einem SELEX gegen pathologisch veränderte Endothelzellen auf diese Weise die Hintergrundbindung durch unspezifische Anlagerungen an Zelloberflächen und durch Bindung an das Matrixmaterial ebenso, wie die Anreicherung von Endothelzell-unspezifischen Aptameren.
- In einem Blended SELEX werden Nicht-Nukleinsäure-Moleküle (wie Peptide) an die Nukleinsäuren angefügt, die den Aptameren über die Bindung hinaus gehende Eigenschaften verleihen. Sie können z.B. auf diese Weise die Enzyme, an die sie binden, chemisch deaktivieren (Smith *et al.*, 1995).
- Im Chimeric SELEX werden zwei oder mehrere verschiedene Bibliotheken eingesetzt, um chimäre Nukleinsäuremoleküle zu produzieren, die mehr als ein gewünschtes Merkmal enthalten oder mehrere Funktionen ausführen können. Jede der Eltern-Bibliotheken wird dabei zunächst auf ein bestimmtes Merkmal hin selektiert. Durch anschließende Fusion der selektierten Aptamere entstehen Nukleinsäuren, die mehrere gewünschte Eigenschaften enthalten (Burke & Willis, 1998).

- Der Deconvolution-SELEX ist eine Strategie für SELEX-Prozesse mit komplexen Targets. Er dient der Unterscheidung relevanter (an bestimmte, interessierende Zielstrukturen im komplexen Gemisch bindende) Aptamere von irrelevanten Oligonukleotiden im selektierten Aptamer Pool (*Blank et al., 2001*).
- Eine weitere Variante ist der Photo-SELEX, bei der die Aptamere photoreaktive Gruppen tragen. Diese Aptamere können Targetmoleküle kovalent binden, photoaktivieren oder -deaktivieren (*Sampson, 2003*). *Golden et al. (Golden et al., 2000)* entwickelten ein SELEX-Verfahren zur Identifizierung von nukleinsäurebindenden Proteinen, bei dem die Aptamere Bromo-Uracil enthalten und über UV-Strahlung kovalent mit einem Protein verknüpft werden. Diese kovalente, sehr stabile Bindung ermöglicht z.B. stringenteren Waschungen oder die Durchführung von Hochdurchsatz-SELEX-Prozessen.
- Eine völlig andere Methode stellt die SPIEGELMER[®]-Technologie dar. Hierbei werden gewöhnliche D-Nukleinsäuren für ein gespiegeltes (enantiomeres) Target selektiert. Die erhaltenen Aptamere werden als L-Isomer synthetisiert und binden nun an das ursprüngliche nicht gespiegelte Target. Diese Spiegelmere sind von hoher medizinischer Bedeutung, da sie nicht durch humane Enzyme abgebaut werden können (*Klussmann et al., 1996; Leva et al., 2002*).

3.2.4.3 FluMag-SELEX

Der FluMag-SELEX (*Stoltenburg et al., 2005*) ist eine Methode zur Selektion von DNA-Aptameren. Dabei wird mit fluoreszenzmarkierten ssDNA-Molekülen und mit magnetischen Beads als Immobilisierungsmatrix für das Target gearbeitet.

Zur Beurteilung des SELEX-Prozesses müssen die Anreicherung der bindenden und die Menge der nicht bindenden Oligonukleotide in jeder Selektionsrunde bestimmt werden. Oft werden radioaktive Markierungen für eine Quantifizierung innerhalb des Prozesses genutzt. Das ist eine sehr sensitive Methode, welche die Detektion geringster Nukleinsäuremengen erlaubt. Der Nachteil dieser Technik besteht darin, dass der gesamte SELEX-Prozess in einem Isotopenlabor durchgeführt werden muss, wodurch ein erheblicher Kostenaufwand entsteht. Zudem ist der Umgang mit radioaktivem Material nicht umweltverträglich und birgt ein Gesundheitsrisiko.

Alternativ dazu können z.B. Fluoreszenz-Labels genutzt werden, welche ein Arbeiten im molekularbiologischen Standard-Labor ermöglichen, zusätzlichen Aufwand vermeiden und eine ausreichend hohe Sensitivität für die Quantifizierung und Detektion von Nukleinsäuren bieten. In der vorliegenden Arbeit werden ssDNA-Oligonukleotide eingesetzt, die am 5'-Ende mit Fluorescein markiert sind. Damit wird eine direkte Quantifizierung der ssDNA-Mengen in den entsprechenden SELEX-Fractionen ohne den zusätzlichen Einsatz von Chemikalien und Lösungen möglich. Zudem kann die DNA ohne weitere Aufarbeitungsschritte unmittelbar nach der Quantifizierung amplifiziert und weiter verwendet werden.

Für eine entsprechende Separation von Aptamer und Target werden die Zielmoleküle beim FluMag-SELEX auf Magnetic Beads immobilisiert. Die Vorteile dieser Immobilisierungs- und Separationstechnik wurden im Abschnitt 3.2.4.1 bereits dargelegt.

3.3 Verwendete Targets für die Aptamergewinnung

3.3.1 Schimmelpilzsporen

3.3.1.1 Schimmelpilze

Pilze sind Organismen, die einen einfachen Vegetationskörper (Thallus) besitzen und denen Pigmente zur Photosynthese fehlen. Sie sind somit auf organisch gebundenen Kohlenstoff angewiesen. Zusammen mit Bakterien spielen Pilze im Boden als Destruenten eine wichtige Rolle, indem sie organische Substanzen zu anorganischen Verbindungen abbauen und sie damit wieder dem Stoffkreislauf zugänglich machen. Sie grenzen sich aber von Bakterien durch den Besitz echter Zellkerne ab.

Eine besondere Gruppe der Pilze sind die Schimmelpilze. Der Begriff „Schimmelpilz“ stammt aus der mikrobiologischen Praxis und umfasst keine systematisch abgegrenzte Pilzgruppe. Kreisel (*Kreisel, 1988*) fasste folgende Kriterien für die Zuordnung eines Pilzes zu den Schimmelpilzen zusammen:

- ruderale Lebensstrategie (Anpassung an nährstoffreiche, aber nur kurzfristig existierende Substrate),
- Bildung eines Hyphenmyzels (im Unterschied zu Hefen),
- hohe Wachstumsgeschwindigkeit (wenige Tage von keimender Spore bis Sporenbildung),
- Bildung großer Mengen an Sporen,
- überwiegend oder ausschließlich vegetative Vermehrung meist durch Konidien (vegetative asexuelle Sporen),
- parasexueller Zyklus, der genetische Rekombination auch ohne sexuelle Fortpflanzung sichert,
- Empfindlichkeit gegenüber Fungistase im Boden (Wachstumsstopp bei Nährstoffmangel, sofortige Sporenkeimung, wenn geeignete Nährstoffe zur Verfügung stehen),
- ubiquitäres Vorkommen (saprobiontische Lebensweise und gering spezialisierter Stoffwechsel ermöglicht Wachstum auf verschiedensten Substraten weltweit in allen Klimazonen),
- Bildung einer großen Zahl an Stoffwechselprodukten (Primär- und Sekundärmetabolite).

Im Allgemeinen entwickeln sich Schimmelpilze in zwei Phasen. In der Wachstumsphase oder vegetativen Phase bildet der Pilz nach Keimung der Sporen ein aus Hyphen bestehendes Myzel aus, welches als Substratmyzel der Ernährung dient und oft im Substrat verborgen wächst. Die Vermehrungsphase oder fruktive Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass sich ein über der Oberfläche des Nährsubstrates erhebendes Oberflächen- oder Luftmyzel ausbildet, auf welchem die der Vermehrung dienenden Konidienträger (Sporenträger) in Form eines farbigen Rasens wachsen (*Schrodt, 1997*).

Die Bestimmung von Schimmelpilzen erfolgt in der Regel auf Grund von morphologischen Bestimmungskriterien. Genetische Marker zur Klassifizierung der Schimmelpilze untereinander sind weniger geeignet, da diese eine ausgeprägte genetische Variabilität besitzen. Das ist auch ein Grund für ihre stark ausgeprägte Anpassungsfähigkeit (*Reiß, 1998*).

Für den Menschen spielen Schimmelpilze sowohl eine positive, als auch eine schädigende, negative Rolle. So sind sie einerseits aufgrund der Vielzahl von Primär- und Sekundärmetaboliten, die sie ausscheiden, vielfältig biotechnologisch nutzbar. Citronensäure, Gluconsäure und Pullulan (Verdickungsmittel) als Primärmetabolite werden industriell mit Hilfe von Schimmelpilzen ebenso hergestellt wie nutzbringende Sekundärmetabolite, z.B. Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine u.a.), β -Carotin, verschiedene Steroide oder Enzyme. Ihre saprobiontischen Leistungen sind in den Kreisläufen der Natur von überragender Bedeutung. Auch diese können gezielt vom Menschen genutzt werden. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist auch die Herstellung und Veredelung von Lebensmitteln mit Hilfe von Schimmelpilzen. So finden sie schon seit Jahrtausenden und bis in die Gegenwart Einsatz bei der Herstellung von Käse, Lebensmittelduft-, -farb- und -aromastoffen, sowie bei der Veredelung durch Fermentierung (*Reiß, 1998*).

Auf der anderen Seite wirken Schimmelpilze als Lebensmittelverderber und Materialzerstörer und haben einen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Mensch und Tier. Sie sind in der Lage, zusammen mit Bakterien und Hefen nahezu alle Lebensmittel abzubauen, ebenso wie verschiedene Bau- und Textilmaterialien (*Schrodt, 1997*).

Ein besonders wichtiger Punkt sind die negativen Auswirkungen der Schimmelpilze auf die menschliche Gesundheit. Gemäß *Sagunsky (Sagunsky, 1997)* sind mögliche Wirkungen bei Schimmelpilzexpositionen folgende: allergisierend, infektiös, inflammatorisch-irritativ, geruchsbildend, krebserzeugend und toxisch. Dabei können Schimmelpilze in mehrerer Hinsicht Probleme verursachen:

- Mykosen: Der Pilz wächst hier parasitisch innerhalb des Wirtsorganismus. Allen voran sind hier die Aspergillose und Hautmykosen zu nennen. Hiervon sind in erster Linie immungeschwächte Personen betroffen (*Fleischmann, 2003*).
- Mykotoxikosen: Hier wirken pilzliche Stoffwechselprodukte, die Mykotoxine auf den menschlichen Körper. (*Keller et al., 1998*). Mykotoxine kommen nicht nur im Myzel, sondern auch in den Konidien vor und besitzen eine zumeist hemmende Wirkung auf die Proteinbiosynthese. Toxinogene Pilzsporen werden unter anderem von *Aspergillus*-, *Fusarium*- und *Penicillium*-Arten produziert (*Johanning, 1998; Maes, 1999; Müller & Herbarth, 1999; Senkpiel & Ohgke, 2001*).
- Neben den Mykotoxinen hat β -1,3-Glucan, ein Bestandteil der Hyphen- und Sporenwand, verschiedene, meist negative Wirkungen auf das Immunsystem (*Flannigan & Miller, 1994*). Zahlreiche Studien belegen die toxische, inflammatorische Wirkung von β -1,3-Glucan. Stellvertretend seien hier die Arbeiten von *Iwamoto et al. (Iwamoto et al., 1998)* und *Beijer et al. (Beijer et al., 2003)* genannt.
- Mykogene Allergien: Viele Schimmelpilzarten können als Allergene wirken. Am häufigsten stellen Sporenanteile, bestehend aus noch nicht ausreichend chemisch charakterisierten Glykoproteinen, die allergene Komponente dar (*Flannigan et al., 1991; Sagunski 1997; Schrodt, 1997*).
- Produktion von flüchtigen organischen Verbindungen (MVOC – microbial volatile organic compounds): Bei diesen Substanzen handelt es sich vor allem um Alkanole, Alkenole, Ketone, Terpene, Ether und Thioverbindungen (*Fleischmann, 2003*). Sie

stehen im Verdacht, Irritationen und Allergien hervorzurufen und auch eine Rolle im Entzündungsgeschehen zu spielen (Flannigan & Miller, 1994; Böck, 2001; Herr & Harpel, 2001; Lehmann et al., 2001).

Schimmelpilzbefall in Wohnräumen

Schimmelpilze sind neben Milben die wichtigsten Innenraumallergene. In zahlreichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen respiratorischen Symptomen bzw. Allergien und dem Vorkommen von Feuchtigkeit und Schimmelpilzbefall festgestellt (Pitten, 1999; Bornehag et al., 2000; Müller et al., 2002). Prinzipiell können alle Menschen, die empfindlich gegenüber Allergenen sind, ab einer Konzentration von etwa 10^6 Sporen/m³ Luft sensibilisiert werden. Das betrifft etwa 20 % der Bevölkerung industrialisierter Länder (Reiß, 1998). Wichtig ist auch die Beobachtung, dass längere Schimmelpilzexposition die Wahrscheinlichkeit erhöht, grundsätzlich Allergien auszubilden (Müller et al., 2002).

In Innenräumen werden am häufigsten Pilze der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* und *Cladosporium* gefunden, wobei Cladosporien auch in der Außenluft saisonal verstärkt vorkommen (Moriske, 2001). In unbelasteten Räumen sollte die Keimzahl im Innenraum deutlich unter der in der Außenluft liegen. Auch sollten sich die Keimarten im Innenraum nicht wesentlich von der in der Außenluft unterscheiden. Speziell pathogene Keime (z.B. *Aspergillus fumigatus*, *Stachybotrys atra*) sollten im Innenraum gar nicht oder nur in minimalen Konzentrationen vorkommen. Die Gesundheit der Bewohner gefährden vor allem die thermophilen Schimmelpilze, die ihre optimale Bebrütungstemperatur bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ besitzen, welche der Körpertemperatur des Menschen entspricht. Deswegen dürfen diese Schimmelpilzarten im Innenraum möglichst nicht vorkommen.

Die Prävalenz der recht xerotoleranten Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* wird in vielen Untersuchungen bestätigt (Horner et al., 1995; Jones, 1999). Einer belgischen Studie zufolge traten in 120 Häusern *Penicillium* und *Aspergillus* mit einer Häufigkeit von etwa 80–90 % auf, wohingegen die Häufigkeit aller anderen Pilzgattungen (außer *Cladosporium*) maximal 43 % betrug (Verhoeff et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wird mit *Aspergillus versicolor* und *Penicillium expansum* als Modellorganismen gearbeitet. Diese beiden Vertreter wurden als relevant und problematisch bei einem Schimmelpilzbefall in Wohnräumen identifiziert (Müller & Herbarth, 1999; Engelhardt et al., 2002).

3.3.1.2 Etablierte Nachweismethoden

Zum Nachweis von Schimmelpilzbefall in Innenräumen ist derzeit eine Reihe von Techniken etabliert. Eine Gebäudeanamnese in Form einer baubiologischen Begehung gibt erste Hinweise auf die Ausdehnung eines möglichen sichtbaren Schimmelpilzbefalls. Genauere Daten liefert die Gesamtkeimzahlbestimmung der Schimmelpilze. Dabei kommen verschiedene Methoden für die Probennahme von luftgetragenen Partikeln zum Einsatz (Senkpiel, 1997). Die Gesamtkeimzahlbestimmung ist mikroskopisch möglich, indem die Partikel direkt auf Objektträgern gesammelt werden. Meist aber wird die Keimbelastung durch Auszählen von Kolonien, nach Sammlung der Sporen auf Medium und nachfolgender Bebrütung, in KBE (**K**olonie-**b**ildende **E**inheiten) angegeben. (Fleischmann, 2003).

Zur genauen Identifizierung der gefundenen Pilzspezies werden Pilzkulturen angelegt und diese anschließend nach erfolgreichem Wachstum und Sporulation morphologisch bestimmt. Das Anlegen von Schimmelpilzkulturen ist notwendig, da im Direktpräparat oft nicht die charakteristischen Pilzstrukturen zu erkennen sind und vitale und tote Strukturen häufig nicht unterschieden werden können (Schrodt, 1997). Allerdings ist der Anteil der kultivierbaren Pilze sehr variabel und vor allem von der jeweiligen Pilzgattung und den Probenahme- und Kultivierungsbedingungen abhängig (Dill, 1998). Die Bebrütungszeit dauert im Durchschnitt 3 bis 5 Tage, im Einzelfall sogar 3 bis 4 Wochen.

Zusätzlich zu den oben charakterisierten klassischen Methoden gibt es noch eine Reihe von neuen und schnelleren Nachweismethoden für Schimmelpilze, die aber noch nicht als Standardverfahren zugelassen sind. Dabei handelt es sich um immunologische Methoden wie ELISA, Immunopräzipitation oder Latexagglutinationstest (z.B. Nachweis bestimmter Schimmelpilzallergene) (Li et al., 2000; Fuhrmann et al., 1992) und molekularbiologische Methoden (z.B. Nachweis über spezifische Gensonden) (Einsele et al., 1997). Außerdem kann eine Bestimmung von Art und Konzentration der von Schimmelpilzen abgegebenen flüchtigen organischen Substanzen (MVOC) mittels HPLC erfolgen. Speziell trainierte Schimmelspürhunde sind ebenfalls in der Lage, Schimmelpilzbelastungen aufzuspüren. (Keller et al., 1998; Moriske, 2001).

Weitere Nachweismethoden sind die Identifikation und Messung von Zellwandbestandteilen wie extrazelluläre Polysaccharide (EPS) (Kamphuis, 1992; Chew et al., 2001), $\beta(1,3)$ -D-Glucan (Chew et al., 2001) oder Ergosterol (Axelsson et al., 1995; Miller & Young, 1997), die Identifikation mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) (Edel, 1998) und die Messung von Mykotoxinen, welche alle eine Alternative zu den klassischen Nachweisverfahren darstellen (Pasanen, 2001).

Es zeigt sich, dass vielfältige Anstrengungen unternommen werden, die etablierten, aber zeitaufwendigen, personal- und geräteintensiven Verfahren durch schnellere und/oder einfachere zu standardisierende Methoden zu ersetzen.

3.3.1.3 Konidien und deren Bestandteile als Targets im SELEX-Prozess

In dieser Arbeit sollen Aptamere für den Nachweis von Schimmelpilzkontaminationen mit Biosensoren in Innenraumluft entwickelt werden. Aus folgenden Gründen wurden Konidien (ungeschlechtliche Sporen) für einen Einsatz als Target im SELEX-Prozess ausgewählt:

- Schimmelpilze zeigen eine weite Variabilität. Demzufolge sollten die Oberflächen der stoffwechselaktiven Zellen des Myzels unter verschiedenen Milieubedingungen variieren. Konidien sind eher stoffwechselinaktiv, so dass sie eine einheitlichere Oberfläche haben sollten.
- Im Gegensatz zu den geschlechtlichen Sporen, die bei *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten eher den Charakter von Dauerformen haben, sind die ungeschlechtlichen Sporen für die Verbreitung der Art zuständig und somit häufiger anzutreffen (Deacon, 1997).
- Konidien werden in der Luft verbreitet, so dass der Mensch ihnen ausgesetzt ist. Das ist insbesondere von Bedeutung, da sie Allergene und Mykotoxine enthalten können (siehe Kap. 3.3.1.1).

- Schimmelpilzsporen sind über Luftprobenahmen zugänglich und daher gut verfügbar.
- Sie sind im SELEX-Prozess leicht handhabbar, da sie z.B. nicht immobilisiert werden müssen. Aufgrund ihrer Größe ist eine Abtrennung durch Zentrifugation möglich.
- Es können für eine Aptamerelektion sowohl ganze Sporen mit oder ohne Vorbehandlung, als auch einzelne Bestandteile oder Bestandteilgemische (z.B. lösliche Sporenfraktion) eingesetzt werden.
- Konidien enthalten sowohl Gattungs- als auch Art-spezifische Bestandteile.

Neben den Konidien, die ein komplexes Target darstellen, sind auch einzelne Sporenbestandteile als definiertes Zielmolekül für die Aptamerelektion geeignet. Die folgende Tabelle (Tab. 3.2) zeigt eine Zusammenstellung von bekannten Sporenbestandteilen für eine mögliche Anwendung im SELEX-Prozess. Auch hier spielen Aufbau und Struktur der Bestandteile, deren Verfügbarkeit und Handhabung bei der Auswahl als Target eine Rolle.

Tab. 3.2: Sporenbestandteile als mögliches Target im SELEX-Prozess

Bestandteile	Besonderheiten	Literatur	Target für SELEX
Kohlenhydrate			
Sialsäure	- N-Acetyl-Neuraminsäure - gefunden u.a. in Konidien verschiedener <i>Aspergillus</i> -Spezies - Sialsäure-Dichte in pathogenen <i>Aspergillus fumigatus</i> 3-20 mal höher als in nicht-pathogenen <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Wasylnka et al., 2001</i>	nicht geeignet, da: - nicht spezifisch - Gehalt in nicht-pathogenen Spezies nicht hoch
Chitin	- Zellwandbestandteil, der für die Festigkeit verantwortlich ist - lineares Polysaccharid aus N-Acetyl-Glucosamin-Resten, die β -1,4-glycosydisch verlinkt sind - einige Autoren gehen von Chitin-haltiger Konidien-Zellwand aus (<i>Aspergillus</i> spp.) - Fluorescein-Lectin-Test für Pilzkontaminationen in Lebensmitteln	<i>Borgia & Dodge, 1992</i> <i>Fukusaki et al., 2000</i> <i>Potts et al., 2001</i>	mögliches Target, aber nicht spezifisch - Aptamer gegen Chitin bereits entwickelt
Glucane	<u>1,3-α-Glucan</u> - nur teilweise in Konidien von <i>Aspergillus</i> - und <i>Penicillium</i> -Spezies gefunden - Bestandteil der äußeren Zellwand <u>1,3-β-Glucan</u> - essentieller Zellwandbestandteil (auch) der Konidien - Homopolysaccharid - kovalent verlinkt mit Chitin (Zellwandfestigkeit!)	<i>Marshall et al., 1997</i> <i>Cole et al., 1991</i> <i>Kurtz & Douglas, 1997</i> <i>Borgia & Dodge 1992</i> <i>Chew et al., 2001</i>	<u>1,3-α-Glucan</u> nicht geeignet, da nicht immer in Konidien enthalten <u>1,3-β-Glucan</u> mögliches Target, aber nicht spezifisch
Fructane	<u>Inulin</u> - ein Teil fest an der äußeren Zellwand der Konidien angeheftet - größtenteils ins umgebende Medium abgegeben	<i>Oláh et al., 1993</i>	mögliches Target, aber nicht spezifisch

3.3 Verwendete Targets für die Aptamergewinnung

Galactomannane	<ul style="list-style-type: none"> - in <i>Aspergillus</i> spp. und <i>Penicillium</i> spp. D-Galacto-D-Mannan, bestehend aus einer Hauptkette aus (1-6)-α-D-Mannopyranosyl-Resten und Seitenketten aus (1-5)-β-Galaktofuranosyl- und (1-2)-α-D-Mannopyranosyl-Resten - (1,5)-β-Galaktofuranosyl-Reste dabei Antigen determinanten 	<p><i>Barreto-Bergter et al., 1981</i></p> <p><i>Kamphuis, 1992</i></p>	mögliches Target, aber teure Herstellung
Extracelluläre Polysaccharide (EPS)	<ul style="list-style-type: none"> - bestehen in <i>Aspergillus</i> spp. und <i>Penicillium</i> spp. hauptsächlich aus Mannose, Galaktose, Glukose - (1,5)-linked-β-Galaktofuranoside sind immunodominant in <i>Aspergillus</i> spp. und <i>Penicillium</i> spp. - <i>Penicillium</i>- und <i>Aspergillus</i>-Spezies produzieren ein immunologisch identisches EPS - EPS nicht in Extrakten aus Konidien von <i>Aspergillus</i> spp. und <i>Penicillium</i> spp. nachweisbar 	<p><i>Barreto-Bergter et al., 1981</i></p> <p><i>Notermans et al., 1988</i></p> <p><i>Notermans & Soentoro, 1986</i></p> <p><i>Fuhrmann et al., 1992</i></p> <p><i>Douwes et al., 1998</i></p> <p><i>Chew et al. 2001</i></p>	nicht geeignet, da: <ul style="list-style-type: none"> - wahrscheinlich nicht in Konidien enthalten - Gemisch aus mehreren Polysacchariden \rightarrow Zusammensetzung abhängig von Kulturbedingungen
Proteine	<ul style="list-style-type: none"> - Konidien enthalten signifikant weniger Protein (5 %) als Hyphen (ca. 25 %) 	<i>Barreto-Bergter et al., 1981</i>	
Glykoproteine	<p><u>Mannoproteine</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Zellwand-Proteine (auch) der Konidien - große Strukturähnlichkeiten zu Zellwandproteinen der Hefen 	<p><i>Cao et al., 1998</i></p> <p><i>Tronchin et al., 1997</i></p>	mögliches Target, aber nicht spezifisch, bzw. spezifische Vertreter nicht bekannt
Hydrophobine	<ul style="list-style-type: none"> - Polypeptide aus ~100 Aminosäure-Resten - bilden die Rodlet-Struktur der Sporen-Zellwand (<i>Aspergillus</i> \rightarrow Hydrophobin RodA) - charakteristisch: ihre Selbstorganisation zu hydrophilen/hydrophoben Grenzflächen - verantwortlich für die Hydrophobizität, und Elektronegativität der Konidien 	<p><i>Giardin et al., 1999</i></p> <p><i>Wösten & de Vocht, 2000</i></p>	mögliches Target, aber nicht spezifisch, bzw. spezifische Vertreter nicht bekannt
Enzyme	<p><u>Pectinase</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Exo-Pectinase in Konidien und Mycelium von <i>Aspergillus</i> spp. gefunden - lokalisiert auf der Konidien-Oberfläche 	<i>Aguilar & Huitón, 1993</i>	mögliches Target, aber nicht spezifisch, bzw. spezifische Vertreter nicht bekannt
Mykotoxine			
Patulin	<ul style="list-style-type: none"> - in <i>Penicillium expansum</i> - ist ein Laktone 	<p><i>Fischer et al., 2000</i></p> <p><i>Shephard & Leggott, 2000</i></p>	mögliches Target, aber: toxisch, karzinogen
Sterigmatocystin	<ul style="list-style-type: none"> - in <i>Aspergillus versicolor</i> - Vorstufe in Aflatoxin-Biosynthese - wahrscheinlich nicht in Konidien enthalten 	<p><i>Fischer et al., 2000</i></p> <p><i>Ostrowski, 1999</i></p>	mögliches Target, aber: toxisch, karzinogen
Citrinin, Roquefortine C	<ul style="list-style-type: none"> - in <i>Penicillium expansum</i> - Citrinin nicht immer gefunden 	<p><i>Samson et al., 1995</i></p> <p><i>Fischer et al., 2000</i></p>	mögliches Target, aber: toxisch, karzinogen

Aversin, Versicolorin A/B	- in <i>Aspergillus versicolor</i> - Aversin nur selten gefunden	<i>Fischer et al., 2000</i>	mögliches Target, aber: toxisch, karzinogen
MVOC	- flüchtige organische Komponenten - <i>Aspergillus versicolor</i> und <i>Penicillium expansum</i> produzieren einige nur für sie spezifischen MVOC - <i>Aspergillus versicolor</i> : 1-(3-Methylphenyl)-Ethanon, 6-Methyl-2-Heptanon; - <i>Penicillium expansum</i> : 1-Methoxy-3-Methylbenzen, Aromadrenden, u.a.)	<i>Fischer et al., 1998</i> <i>Fischer et al., 1999</i> <i>Pasanen et al., 1997</i>	nicht geeignet, da: -flüchtige Komponenten, die nicht in oder an den Konidien lokalisiert sind
Pigmente			
Versicolorin	- in <i>Aspergillus versicolor</i> - Furofuran-Ring-System von Versicolorin A sehr ähnlich dem von Sterigmatocystin und Aflatoxin B ₁ und G ₁ - Vorstufe in Aflatoxin-Biosynthese	<i>Kingston et al., 1976</i>	mögliches Target, aber: toxisch, karzinogen
Fette			
Ergosterol	- Gehalt in Sporen variiert um ca. 25 % je Spezies - in <i>Aspergillus versicolor</i> und <i>Penicillium brevicompactum</i> ca. 2.5 pg/Spore - in <i>Penicillium chrysogenum</i> 5-30 pg/Spore - spezifisch für Pilze	<i>Miller & Young, 1997</i> <i>Axelsson et al., 1995</i>	mögliches Target, aber nicht spezifisch für Schimmelpilze

Einige Sporenbestandteile scheinen durchaus geeignet für ihren Einsatz als Target in einem SELEX-Prozess. Bestandteile, die nicht spezifisch für eine bestimmte Schimmelpilzart sind, bzw. deren spezifische Vertreter nicht bekannt sind, können dennoch interessant für den allgemeinen Nachweis einer Schimmelpilzbelastung sein. Toxische und/oder karzinogene Sporenbestandteile wurden wegen ihres Gefahrenpotenzials bei der Handhabung für eine Verwendung ausgeschlossen.

Für eine Nutzung als definiertes Target im SELEX-Prozess wurde im Rahmen dieser Arbeit β -1,3-Glucan ausgewählt. Wie bereits vorher ausgeführt, ist dieses Polysaccharid in den Sporen von Schimmelpilzen enthalten. Es ist ein Bestandteil, der gesundheitsschädlich wirken kann (siehe Kap. 3.3.1.1). Außerdem kann man β -1,3-Glucan in ausreichenden Mengen käuflich erwerben. Das dem β -1,3-Glucan der Schimmelpilze ähnlichste, kommerziell verfügbare Glucan ist Laminarin, ein lineares β -1,3-D-Glucan mit 1,6-Seitenketten, welches aus *Laminaria digitata*, einer Meeresalge, gewonnen wird. Laminarin wurde bereits zum Nachweis von Schimmelpilzkontaminationen mittels ELISA eingesetzt (*Douwes et al., 1996; Milton et al., 2001*) und findet wegen seiner prinzipiellen Eignung und guten Verfügbarkeit hier Verwendung als Target im SELEX-Prozess.

3.3.2 Ethanolamin

Ethanolamin (auch Colamin, Monoethanolamin oder 2-Aminoethanol) diente in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit als Target für die Aptamerelektion. Seine industrielle und medizinische Bedeutung machen es als Zielmolekül für eine Aptamerelektion interessant. Zudem ist für ein so kleines molekulares Target bislang noch kein Aptamer entwickelt worden (siehe Kap. 3.2.1). Ethanolamin spielt somit auch eine Rolle als

3.3 Verwendete Targets für die Aptamergewinnung

Modelltarget für die Generierung von Aptameren für besonders kleine, einfach strukturierte Targets. Ethanolamin besitzt ein Molekulargewicht von 61,08 g/mol. Es besteht aus einem einfach verknüpften C₂-Grundgerüst, bei dem jedes C-Atom eine funktionelle Gruppe trägt (Hydroxyl- und Aminogruppe).

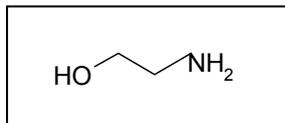


Abb. 3.5: **Strukturformel von Ethanolamin**

Monoethanolamin ist eine farblose, ätzende Flüssigkeit, die als Grundstoff in der chemischen Industrie eingesetzt wird. So findet es Verwendung als Kühlschmierstoff, als organisches Lösungsmittel in der Zellstoff- und Farbstoffindustrie, als Zusatz in Reinigungsmitteln und Kosmetika, als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Tensiden und Kunstharzen, sowie als CO₂- und H₂S-Absorptionsmittel. Zudem wird es in der Forschung und in der Medizin eingesetzt, u.a. als Trennflüssigkeit bei der Herstellung von Pharmaka oder als Zusatz bei Immobilisierungsreaktionen. In der Luft wird Monoethanolamin mittels Ionenchromatographie nachgewiesen.^{1,2}

Weitere Ethanolamine sind Di- und Triethanolamin, welche in Lösungsmitteln, Emulgatoren und Reinigungsmitteln Anwendung finden. Diethanolamin wirkt zudem als Weichmacher in Körperlotionen oder als Feuchthaltemittel in Hautpflegeprodukten. Die besondere Gefahr dieser Moleküle besteht in der Möglichkeit der Bildung krebserzeugender Nitrosamine, wenn sie zusammen mit Nitraten verarbeitet werden. Aber auch ohne Nitratverbindungen besitzen sie krebserzeugendes Potenzial und sollen daher in Pharmazeutika und Kosmetika nicht mehr eingesetzt werden. Ethanolamine sind unter anderem auch haut- und schleimhaut-reizend, beeinträchtigen den Schutzmechanismus der Haut, können Allergien auslösen und das zentrale Nervensystem schädigen.^{3,4}

Ethanolamin gehört zur Gruppe der aliphatischen Monoamine, die zu den biogenen Aminen gezählt werden. Bei biogenen Aminen handelt es sich um stickstoffhaltige, basische Verbindungen, die eine aliphatische, aromatische oder heterocyclische Struktur besitzen können. Sie entstehen im Stoffwechsel von Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen als Abbauprodukte von Aminosäuren. Biogene Amine haben im Stoffwechsel und in Lebensmitteln eine vielseitige Bedeutung. Sie wirken u.a. als Hormone (Katecholamine, Serotonin), Wachstumsfaktoren (Putrescin, Spermidin, Spermin), dienen als Pharmaka und stellen Gewebsmediatoren dar (Histamin, Serotonin). Sie spielen eine Rolle in Lebensmitteln als Aroma- und Geschmacksstoffe, als Vorstufen zu Biosynthesen von Alkaloiden und Nitrosaminen, und tragen zur Qualitätsbeurteilung von Lebensmitteln, insbesondere Fisch, bei. In bestimmten Grenzen sind biogene Amine völlig unbedenklich, da der menschliche

¹ <http://www.biologie.de/w/index.php/Ethanolamin> [letzte Aktualisierung 01.06.2005]

² <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/industrialchem/organic/MONOETHANOL%20AMINE.htm> [gelesen 08.01.2007]

³ http://www.wohlfuehl-abc.de/Neways/Neways_DEA.php [gelesen 08.01.2007]

⁴ http://ecb.jrc.it/classlab/3002a09-III_IND_diethanolamine.pdf [gelesen 08.01.2007]

Körper sie abbauen kann. Werden diese Stoffe jedoch in größeren Mengen aufgenommen, können sie gesundheitliche Beeinträchtigungen, wie Kopfschmerzen, Migräne und Magen-Darm-Beschwerden verursachen (Baek, 1999).

Ethanolamin spielt in diesem Zusammenhang hauptsächlich eine Rolle als Abbauprodukt stickstoffhaltiger Verbindungen. Nachgewiesen wird der Anteil an Ethanolamin hierbei (z.B. bei der Qualitätsbeurteilung von Lebensmitteln) mit Verfahren wie Gaschromatographie (GC) und Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Baek, 1999).

Eine große Bedeutung kommt Ethanolamin bei der Synthese von Phospholipiden zu. Phospholipide kommen in großen Mengen in biologischen Membranen vor, wo sie neben Glykolipiden und Cholesterol den höchsten Anteil der Membranlipide stellen (Stryer, 1991). Wichtige Phospholipide sind z.B. Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol. Zur Bildung von Phosphatidylethanolamin im Körper kommt es durch Umwandlung des über die Nahrung aufgenommenen Ethanolamins. Diese Umwandlung kann auf verschiedenen Wegen stattfinden, wobei jedoch nur der von Kennedy und Weiss (Kennedy & Weiss, 1956) beschriebene „Kennedy-Weg“ eine *de novo* Synthese darstellt (Phosphatidylethanolaminbildung aus CDP-Ethanolamin und Diacylglycerol mit Hilfe des Enzymes Ethanolamin-Phosphotransferase). Alle anderen Synthesewege führen über Modifikationen bereits existierender Phospholipide, wie die Decarboxylierung des Phosphatidylserins oder den bei Säugetieren (Vance, 2002) und einigen Pflanzenarten (Moore, 1975; Vincent et al., 1999) gezeigten Kopfgruppentausch zwischen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin. Dieser Kopfgruppentausch wurde auch mit Phosphatidylcholin nachgewiesen (Manoharan et al., 2000). Darüber hinaus kann aus Ethanolamin durch die Bindung von drei Methylgruppen an das Stickstoffatom Cholin hergestellt werden, welches als Vorstufe des wichtigen Neurotransmitters Acetylcholin dient.

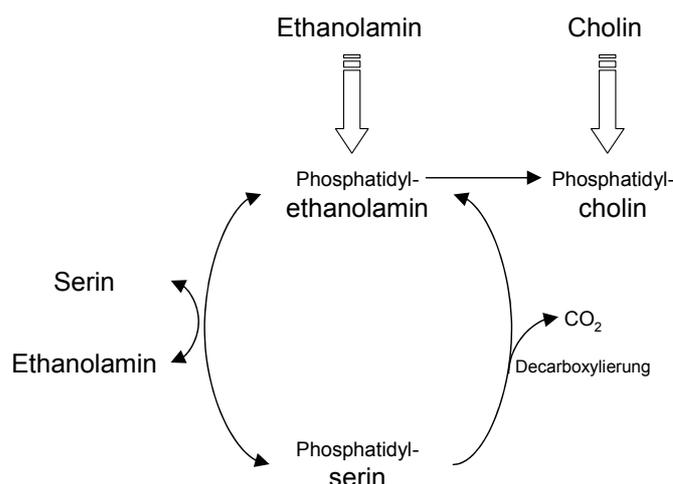


Abb. 3.6: Vereinfachtes Schema der Wege zum Phosphatidylethanolamin und -cholin (nach Lehninger et al., 1998)

All das verdeutlicht, dass es bei einer Störung des stark ineinander verzahnten Aufbaus der Phospholipide zu Ungleichgewichten im Aufbau der Membranen kommen kann. Da den Zellmembranen eine grundlegende Bedeutung in den Organismen zukommt, kann man bei Defekten des Membranaufbaus mit Auswirkungen auf den gesamten Organismus rechnen. Im Bezug auf Ethanolamin werden neuronale Krankheiten wie Alzheimer und Schizophrenie und die Stoffwechselkrankheit Ethanolaminose mit Störungen im Ethanolaminhaushalt des Menschen in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass ein Mangel an Ethanolamin-Plasmalogenen eine Veränderung der Phospholipidmembranen verursacht, die mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht wird (*Farooqui et al., 1997*). Auch in Membranen von Schizophrenie-Kranken wurden Missverhältnisse in der Zusammensetzung der Phospholipide gefunden, bei denen sich reduzierte Mengen an Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zeigten (*Peet et al., 2000*).

Bei der Krankheit Ethanolaminose fehlt durch einen genetischen Defekt das Enzym Ethanolaminkinase, welches für die Verknüpfung von Ethanolamin mit einem Phosphatrest und somit für die Synthese von Phosphoethanolamin verantwortlich ist. Ethanolamin steht dem Organismus daher nicht in seiner physiologisch verwertbaren, phosphorylierten Form zur Verfügung und wird in Organen und Geweben abgelagert. Das führt zum Tod der betroffenen Personen schon im frühesten Kindesalter, wobei die Ursache meist unerkannt bleibt (*Vietor et al., 1977*).

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte und Materialien

Die Herkunft der genutzten Geräte wird im jeweiligen Kapitel genannt.

Alle ohne Herkunftsvermerk aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma VWR, Deutschland bezogen und hatten p.a.-Qualität.

Häufig verwendete Puffer

Bindungspuffer [pH 7,4]	NaCl	100 mM
	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl	20 mM
	MgCl ₂	2 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Tween20	0,02 %
TE-Puffer [pH 7,4]	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl	10 mM
	Na-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	1 mM
10x TBE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	900 mM
	Borsäure	900 mM
	Na-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	20 mM
	→ Arbeitslösung: 1x TBE	
10x PBS-Puffer [pH 7,35]	KH ₂ PO ₄	14,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	81 mM
	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	→ Arbeitslösung: 1x PBS	
0,1M Na-Phosphat-Puffer [pH 7,4]	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,62 g/L
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,42 g/L

4.2 Präparation von Schimmelpilzsporen

Zur Aptamers Selektion für Schimmelpilzsporen wurden

- intakte Konidien (vegetative asexuelle Sporen) mit verschiedenen Vorbehandlungen
- die lösliche Sporenfraktion nach Aufschluss der Schimmelpilzsporen und
- definierte Sporenbestandteile

als Target im SELEX-Prozess eingesetzt.

4.2.1 Gewinnung der Sporen

Die Typstämme folgender Pilze aus der Stammsammlung des Departments Expositionsforschung/Epidemiologie (UFZ Leipzig) wurden für die Aptamergewinnung verwendet: *Penicillium expansum* (DSM 1282), *Aspergillus versicolor* (DSM 1943) und *Penicillium*

brevicompactum (DSM 3825). Die Kultivierung der Schimmelpilzarten erfolgte auf DG18-Medium für ~3 Wochen bei RT in Gewebekulturflaschen. Nach Ausbildung eines geschlossenen Pilzrasens auf der Agaroberfläche und ausreichender Sporulation wurden die Sporen mit 10–15 mL Tween20-Wasser (0,1 % Tween20 in A. bidest.) durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken von der Oberfläche abgeschwemmt. Die Zahl der gewonnenen Sporen wurde im Phasenkontrastmikroskop (BX 60, Olympus) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Lagerung der Sporen wurde die Suspension mit 12–15 % Glycerin versetzt. Aliquote zu je $\sim 10^8$ Sporen wurden hergestellt und bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.2.2 Sporen-Vorbehandlungen

Nachdem in vorhergehenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe festgestellt worden war, dass eine Aptamere Selektion für intakte, unvorbehandelte Schimmelpilzsporen nicht möglich ist (Kirsten, 2001, Stoltenburg & Strehlitz, 2003), wurden in dieser Arbeit Möglichkeiten gesucht, um an die Strukturen unter den stark hydrophoben Sporenoberflächen zu gelangen. Die Sporen wurden verschieden vorbehandelt (Hitze, Quellung) und schließlich aufgeschlossen.

Thermische Vorbehandlung

Die thermische Vorbehandlung erfolgte unmittelbar vor jeder SELEX-Runde während der Vorwaschschritte. Die benötigte Menge Sporen wurde aufgetaut und 2x mit 500 μL Bindungspuffer gewaschen. Für die Abtrennung der Sporen vom sie umgebenden Puffer wurde eine 1,5 min Zentrifugation bei 2300 x g, RT (Centrifuge 5415D, Eppendorf) durchgeführt. Danach folgte eine Inkubation bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min im Thermomixer (800 rpm, Thermomixer compact, Eppendorf). Anschließend wurde noch 6x mit je 500 μL Bindungspuffer gewaschen, bevor die thermisch behandelten Sporen im SELEX eingesetzt wurden.

Quellung der Sporen

Um gequollene Konidien zu erhalten wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Dazu wurden Aliquots mit je 10^8 Sporen nach dem Auftauen 3x in je 500 μL PBS, pH 7,35 gewaschen. Anschließend wurden je 2×10^7 Sporen mit je 1 mL der folgenden Inkubationslösungen versetzt und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Thermomixer (800 rpm) inkubiert.

Inkubationslösungen:

- 2 % Malzextrakt (Merck), sterilfiltriert
- 1 % Hefeextrakt (DIFCO), sterilfiltriert
- PBS, pH 7,35, sterilfiltriert

Nach 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h und 26 h (ÜN) wurden je 50 μL der gequollenen Sporensuspension entnommen und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Zur Kontrolle wurden 2×10^7 Zellen mit 1 mL PBS, pH 7,35 bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Im SELEX-Prozess kamen Sporen zum Einsatz, die 5 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in 2 % Malzextrakt vorgequollen wurden. Nach der Quellung wurden die einzelnen Aliquots zu je 10^8 Sporen

mit 12–15 % Glycerin versetzt und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Für jede SELEX-Runde wurde nur die benötigte Menge vorgequollener Konidien aufgetaut.

4.2.3 Aufschluss der Sporen

Es wurden mehrere Methoden getestet, um die Schimmelpilzsporen effizient aufzuschließen. Die Versuche fanden jeweils sowohl mit vorgequollenen, als auch unbehandelten Konidien statt. Nach dem Auftauen wurden die Sporensuspensionen zunächst 3x mit je 1 mL PBS, pH 7,35 für je 5 min bei 21 °C im Thermomixer (1200 rpm) gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde ihre Zahl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt.

Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff

Je 10^8 Sporen wurden in 1 mL PBS, pH 7,35 + 1 % Protease-Inhibitor (Protease-Hemmer-Cocktail für Pilze/Hefen, SIGMA) aufgenommen. Diese Suspension wurde tropfenweise in flüssigen Stickstoff gegeben und in einem ständig nachgekühlten Mörser zu weißem Pulver vermahlen (5–10 min). Das Pulver wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und aufgetaut. Es erfolgte eine optische Kontrolle unter dem Mikroskop.

Zellaufschluss mit Ultraschall

Ein weiterer Versuch bestand darin, eine Ultraschallbehandlung vor den Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff vorzuschalten, um die Sporen vollständiger aufzubrechen. Auch dazu wurden zunächst 10^8 Sporen in je 1 mL PBS, pH 7,35 + 1 % Protease-Inhibitor resuspendiert. Es erfolgte eine Behandlung mit einer Ultraschallsonde (Sonotrode UW70, Bandelin) für 3 min, 2 min und eine Minute (Cycle 70 %, Power 70 %) mit je einer Pause von 2 min zur Zwischenkühlung auf Eis. Die Sporensuspensionen standen während der Prozedur in einem Eisbad. Anschließend wurde ein Zellaufschluss in flüssigem Stickstoff durchgeführt (siehe oben) und der Erfolg mikroskopisch kontrolliert.

Zellaufschluss mittels Kugelmühle

Für den Aufschluss in einer Kugelmühle (Schwingmühle MM301, Retsch) wurden die Sporen in PBS, pH 7,35 oder Bindungspuffer, jeweils unter Zusatz von 1 % Protease-Inhibitor, aufgenommen. Zu je 500–600 μ L Sporensuspension (je $\sim 10^8$ Sporen) wurden 500 mg Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5 mm gegeben. Der Aufschluss in der Mühle erfolgte für 2x 5 min bei 30 Hz. Zwischen beiden Schritten wurde für 5 min auf Eis zwischengekühlt.

Der Zellaufschluss wurde unter dem Mikroskop überprüft.

Nach dem Aufschluss mit der Kugelmühle (siehe oben) wurden die Glaskügelchen aus der Suspension entfernt (kurzes Abzentrifugieren). Um die Zelltrümmer abzutrennen, fand eine zweimalige Zentrifugation für je 30 min bei 16000 x g, 4 °C statt. Der Überstand mit den löslichen Sporenbestandteilen wurde gesammelt und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay (siehe Kap. 4.4.1) bestimmt.

4.3 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

4.3.1 Quantifizierung

Quantifizierung von DNA mittels UV-Absorptionsspektroskopie

Eine exakte Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen erfolgte durch photometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf). Einem OD-Wert von 1 entspricht eine Konzentration von ca. 50 µg/mL doppelsträngiger DNA und 33 µg/mL einzelsträngiger DNA (Sambrook & Russel, 2001). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ~5 ng/mL ssDNA (Stoltenburg & Strehlitz, 2003). Das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zeigt dabei zusätzlich die Reinheit der Nukleinsäuren. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner; liegt der Wert deutlich über 2, dann liegt eine Verunreinigung mit RNA vor. Für die Berechnung der Molarität wurde eine durchschnittliche Masse von 327 g/mol pro Nukleotid angenommen.

Quantifizierung von ssDNA mittels OliGreen™

OliGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell für die Quantifizierung von unmarkierter ssDNA in Lösung geeignet ist (OliGreen™ ssDNA Quantitation Kit, Molecular Probes). Freier Farbstoff zeigt keine Fluoreszenz, während nach dessen Bindung an ssDNA eine ausgeprägte Fluoreszenz nachweisbar ist. Freie Nukleotide, dsDNA oder RNA werden nicht erfasst.

Die OliGreen™ Messungen erfolgten in Mikrotiterplatten (96 well, PP, schwarz, NUNC) entsprechend den Herstellerangaben. Die vorbereiteten Proben (100 µL) wurden in den Wells der Mikrotiterplatten mit dem gleichen Volumen der frisch zubereiteten OliGreen™ Arbeitslösung versetzt. Nach einer kurzen Inkubation des Ansatzes für 3-5 min bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz gemessen (Wallac 1420 Victor²V Multilabel Counter, PerkinElmer Wallac; Messbedingungen: prompt fluorimetry, Wellenlänge Ex 485 nm / Em 535 nm, Messzeit 1 sec, CW-Lampenenergie 9728, Probenvolumen 200 µL). Die Bestimmung der ssDNA-Konzentration in den Proben erfolgte über eine Kalibrierkurve, die mit der random DNA Oligonukleotid-Bibliothek in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/mL bis 800 ng/mL unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurde. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 10 ng/mL ssDNA (entspricht 2 ng/Messvolumen) (Stoltenburg & Strehlitz, 2003).

Quantifizierung Fluorescein-markierter ssDNA mittels Fluoreszenzmessung

Durch Einführung einer Fluoresceinmarkierung am 5'-Ende der ssDNA wurde eine direkte Bestimmung des DNA-Gehaltes durch Messung der Eigenfluoreszenz, ohne Zusatz spezieller Lösungen möglich. Die Proben konnten nach der Messung unmittelbar weiter bearbeitet werden. Die DNA wurde in der PCR mit einem modifizierten Primer, welcher am 5'-Ende ein Fluoresceinmolekül trägt (Primer AP60, siehe Kap. 4.5.2), markiert. Der relevante DNA-Strang wurde anschließend aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt gereinigt (s. Kap. 4.5.4). Analog zur OliGreen™ Quantifizierung wurden die Messungen in Mikrotiterplatten bei einem Messvolumen von 100 µL durchgeführt. (96 well Platten aus PP,

schwarz, NUNC; Wallac 1420 Victor²V Multilabel Counter, PerkinElmer Wallac; Messbedingungen: prompt fluorimetry, Fluorescein, Wellenlänge Ex 485 nm / Em 535 nm, Messzeit 1 sec, CW-Lampenenergie 15000). Je Probe wurden zwei bis drei Parallelmessungen aus einem gemeinsamen Verdünnungsansatz durchgeführt. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben erfolgte auch hier eine Aufnahme einer Kalibriergeraden mit definierten Mengen an markierter ssDNA (10 ng/mL bis 1000 ng/mL). Die Nachweisgrenze lag unter den angewandten Bedingungen bei 10 ng/mL fluoreszenzmarkierter ssDNA (entspricht 1 ng/Messvolumen) (Stoltenburg & Strehlitz, 2003).

4.3.2 Ethanolfällung

Die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung und weiteren Reinigung von Nukleinsäuren ist die Präzipitation mit Ethanol. In Gegenwart monovalenter Kationen bilden DNA und RNA einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird.

Da bei der Aptamerherstellung mit sehr geringen Mengen an DNA und kleinen ssDNA Fragmenten (<100 nt) gearbeitet wird, ist es notwendig, einen Carrier zur besseren Präzipitation zuzusetzen. In der Literatur werden dafür verschiedene Substanzen empfohlen, wie z.B. Glycogen, tRNA oder Heringssperma-DNA. Gaillard und Strauss (Gaillard & Strauss, 1990) beschrieben einen erfolgreichen Einsatz von linearem Polyacrylamid, als einen sehr effizienten und neutralen Carrier für die Präzipitation geringer DNA Mengen (pg-Bereich) mit Ethanol.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu der zu fällenden DNA Lösung 6 µL 0,25 %iges lineares Polyacrylamid (Gaillard & Strauss, 1990), 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat [pH 5,2] und 2,5 Volumen Ethanol (96 %) zugegeben. Die Fällung erfolgte bei -70 °C für mindestens 30 min. Der Niederschlag wurde bei 4 °C für >15 min bei 13.500 x g abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 500 µL 70 %igem Ethanol gewaschen, bei gleichen Bedingungen 10 min zentrifugiert und nach der Entfernung des Überstandes im Rotationsverdampfer (Concentrator 5301, Eppendorf) für 15 min getrocknet. Die DNA konnte dann in entsprechenden Puffern oder A. bidest. aufgenommen und weiter bearbeitet werden.

4.3.3 Gelelektrophorese

Agar-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten in nicht denaturierenden Agar-Gelen wurde in Flachgelapparaturen (BIOMETRA) gemäß Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Fragmentlänge erfolgte die Elektrophorese unter Verwendung von 0,8–2 % DNA-Agar (SERVA) in 1x TBE-Puffer. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/mL zugesetzt (Sambrook & Russel, 2001; Gassen & Schrimpf, 1999).

Die DNA Proben wurden vor der Elektrophorese mit Gel-Loading Puffer (1x GLB) versetzt.

5x Gel-Loading-Buffer: (GLB [B/X/O])	Glycerin	50 %
	TE	1x
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2 %
	Farbstoff:	je 0,25 %
	[B] Bromphenolblau	
	[X] Xylencyanol	
	[O] Orange G	
Arbeitslösung: 1x GLB		

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 6–8 V/cm Gellänge für 45–50 min. Die aufgetrennte DNA konnte anschließend durch die Absorption des interkalierten Ethidiumbromids mittels eines UV-Transilluminators (BioDocAnalyse, Biometra) bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Größe der DNA Fragmente wurde anhand geeigneter Längenstandards (25 bp oder 100 bp DNA Ladder, Invitrogen GmbH, 0,5 µg/Slot) abgeschätzt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinigung der ssDNA Oligonukleotide erfolgte mittels einer 200x200x1 mm präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter stark denaturierenden Bedingungen. Die verwendeten Polyacrylamid (PAA)-Gele setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 8 bzw. 10 % Acrylamid / N,N'- Methylenebisacrylamid (9,5 / 0,5)
- 1x TBE
- 7 M Harnstoff
- 20 % Formamid

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,05 % Ammoniumpersulfat (APS) und 0,05 % Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet und war nach ~1,5 h abgeschlossen.

Das Gel wurde anschließend in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt (Protean II xi Cell, BIO-RAD) und bei 500 V einem 20 min Vorlauf unterzogen.

Die DNA Proben wurden unmittelbar vor dem Lauf mit dem gleichen Volumen an Formamid-Farbmarker (FF) versetzt, 5 min bei 94 °C inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt.

2x Formamid-Farbmarker: (FF[B/O])	Formamid	98 %
	Na- Ethylendiamintetraacetat	20 mM
	[B] Bromphenolblau	0,05 %
	[O] Orange G	0,05 %

Der verwendete DNA Marker (25 bp Ladder, Invitrogen GmbH; 0,75 µg/Slot) zur Größenabschätzung der Fragmente im Gel wurde entsprechend der Proben vorbehandelt.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 400 V für ~2 h. Als Laufpuffer diente 1x TBE.

Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/mL in 1x TBE) für ~15 min gefärbt, anschließend für ~15 min mit A. bidest. entfärbt und konnte schließlich unter UV-Licht ausgewertet werden (312 nm, UV-Transilluminator).

Bei gelelektrophoretischer Auftrennung von Fluorescein-markierter DNA ist die Visualisierung unter UV-Licht durch die Eigenfluoreszenz der markierten DNA-Stränge möglich.

Bei der Auswertung nicht markierter DNA wurde mit der Methode des UV-Shadowing gearbeitet (*Hassur & Whitlock, 1974*). Dabei wird das ungefärbte Gel beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Kieselgelplatte mit integriertem Fluoreszenzfarbstoff (TLC-Platte Kieselgel60F254, MERCK) gelegt. Durch Fluoreszenzlöschung unter einer UV-Lampe bei 254 nm wird die DNA als dunkle Bande vor einem gleichmäßig fluoreszierenden Hintergrund sichtbar.

4.3.4 Gelelution

Zur Wiedergewinnung von ssDNA aus denaturierenden PAA-Gelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht markiert (über Visualisierung mittels UV-Shadowing bzw. der Eigenfluoreszenz Fluorescein-markierter ssDNA) und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur passiven Elution der DNA wurden die zerkleinerten Gelstückchen mit dem fünffachen Volumen Elutionspuffer (PAGE-EB) versetzt und ÜN bei 4 °C und anschließend 45 min bei 80 °C unter Schütteln (Thermomixer, 1200 rpm) inkubiert (*Sambrook & Russel, 2001; Gassen & Schrimpf, 1999*).

PAGE-Elutionspuffer: [pH 7,8]	Na-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	2 mM
	Na-acetat	300 mM
	Essigsäure	zum Titrieren

Die Suspension wurde mittels einer Zentrifugation (800 x g, 30 sec, RT) durch silanisierte Glaswolle filtriert und die Nukleinsäuren anschließend mit Ethanol präzipitiert (siehe Kap. 4.3.2).

4.4 Arbeitstechniken im Umgang mit Proteinen

4.4.1 Proteinbestimmung

Der Gehalt an Proteinen in Lösung wurde nach dem Verfahren von Bradford (*Bradford, 1976*) bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum in einer sauren Lösung von Coomassie Brillant Blau G-250 nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Bei geeigneter Wahl von Protein- und Farbstoffkonzentration besteht ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 595 nm und dem Proteingehalt der Lösung.

Der Test wurde in Einweg-Halbmikroküvetten durchgeführt (BRAND) und erlaubte Analysen im Bereich von 0,01–0,1 mg/mL Protein (Messbereich 1, Mikrobereich) bzw. von 0,2–1,4 mg/mL Protein (Messbereich 2). Für den Messbereich 1 (Mikrobereich) wurden Standardkonzentrationen von 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 und 0,1 mg/mL Rinder-IgG (SIGMA), für den Messbereich 2 von 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 und 1,4 mg/mL Rinder-IgG in Bindungspuffer hergestellt. Dazu wurden für Messungen im Mikrobereich, je 40 µL IgG-Lösung der jeweiligen Standardkonzentration mit 400 µL der Bradford-Fertiglösung (Bioquant® Protein, MERCK) vermischt und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT bei

595 nm vermessen (BioPhotometer, Eppendorf). Für den Messbereich 2 kamen 10 µL des jeweiligen IgG-Standards und 500 µL Bradford-Fertiglösung zum Einsatz.

Mit den Proteinproben wurde analog verfahren. Die Proteinkonzentrationen konnten direkt am Photometer durch die interne Kalibrierkurvenberechnung abgelesen werden.

4.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

In einigen Fällen war es nötig, die Proteine vor ihrer Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-elektrophorese (siehe Kap. 4.4.3) aufzukonzentrieren. Dazu wurden die Protein-Proben 1:1 mit einer 20 %igen TCA-Lösung gemischt (→ Endkonzentration 10 % TCA), 60 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 16.000 x g, 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet zweimal mit je 1ml eiskaltem Aceton gewaschen. Um das Proteinpellet möglichst vollständig zu resuspendieren, wurden die Proben während jedes Waschschriffes für jeweils 2 min im Ultraschallbad bei 35 kHz behandelt (Transsonic 460/H, Elma). Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 16.000 x g, 4 °C, wurde das Aceton entfernt und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) für 10–15 min getrocknet. Die Proben wurden in je 100 µL Laemmli-Probenpuffer (siehe Kap. 4.4.3) aufgenommen.

4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Separation von Proteinen wurde die diskontinuierliche denaturierende Gelelektrophorese (*Laemmli, 1970*) eingesetzt. Mit dieser Methode werden Proteine entsprechend ihrer Molmasse getrennt. Durch die Beladung mit dem stark negativen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird der Einfluss unterschiedlicher Oberflächenladungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine aufgehoben.

Die Auftrennung erfolgte in einem 80 x 60 x 0,75 mm Minigelsystem (Mini PROTEAN 3 System) von BIO-RAD. Die Gele setzten sich aus einem der Fokussierung dienenden Sammelgel (4 % Polyacrylamid) und einem separierendem Trenngel (12 % Polyacrylamid) zusammen. Vor dem Auftrag wurden die Proben TCA-gefällt (siehe Kap. 4.4.2), in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 60 °C erhitzt. Als Längenstandard diente der LMW-Marker Kit (14,4–97 kDa) der Firma GE Healthcare. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA/Gel und 6 W für ~1 h durchgeführt, nachdem ein Vorlauf (10 mA/Gel, 3 W, ~20 min) für das Eindringen ins Gel erfolgt war.

Trenngellösung:	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	12 %
	Tris/HCl, pH 8,8	375 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2 %
	Start der Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED, zu einer Endkonzentration von je 0,075 %	

Sammelgellösung:	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	4 %
	Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,2 %
	Start der Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED, zu einer Endkonzentration von je 0,075 %	

Laufpuffer:	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1 %

Laemmli-Probenpuffer:	Tris/HCl, pH 6,8	63,5 mM
	Glycerin	10 %
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 %
	Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,5 %

4.4.4 Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen

Coomassie-Färbung von Proteinen

Um die Proteinbanden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Gele zunächst kurz in A. bidest. gewaschen, anschließend ÜN in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und schließlich in A. bidest. entfärbt. Diese Methode erlaubt die Identifizierung von bis zu 30 ng Protein (*Proske, 2001*).

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue	0,2 %
	ortho-Phosphorsäure	1,6 %
	Methanol	20 %

4.5 SELEX-Prozess

4.5.1 Prinzip des ssDNA-SELEX-Prozesses

Der SELEX-Prozess zur Gewinnung von ssDNA-Aptameren für ein bestimmtes Zielmolekül ist ein sich wiederholender Kreisprozess. Ausgehend von der random ssDNA-Bibliothek (siehe Kap. 4.5.2) werden über verschiedene Selektions- und Amplifikationsschritte etappenweise die besten Binder für das entsprechende Target herausgefiltert und angereichert. Jede Runde des Prozesses (siehe Abb. 4.1) besteht aus folgenden Teilschritten: Bindung der ssDNA an das Zielmolekül, Waschen des ssDNA-Target-Komplexes zur Entfernung ungebundener ssDNA, Elution der gebundenen ssDNA vom Zielmolekül, Amplifikation der erhaltenen DNA und Reinigung der relevanten ssDNA aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt. Nach jeder Runde wurde der vorselektierte und angereicherte ssDNA-Pool als Ausgangsmaterial für die nächste Runde genutzt. Gewöhnlicherweise wurde der Prozess nach 8 bis 10 Runden abgebrochen. Im Falle einer messbaren Anreicherung Target-spezifischer ssDNA wurde diese in der letzten SELEX-Runde nach der Amplifikation kloniert und einzelne Aptamerklone sequenziert. Auf diese Weise kann die Zusammensetzung des angereicherten, spezifischen Aptamer-Gemisches untersucht und einzelne Aptamerklone hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften analysiert werden.

Der SELEX-Prozess wurde entweder mit intakten Schimmelpilzsporen als Target durchgeführt oder mit immobilisierten Targetmolekülen in Form eines FluMag-SELEX. Bei dieser in unserer Arbeitsgruppe entwickelten SELEX-Variante werden während des Prozesses magnetische Beads als Immobilisierungsmatrix und fluoreszenzmarkierte DNA verwendet (*Stoltenburg et al., 2005*).

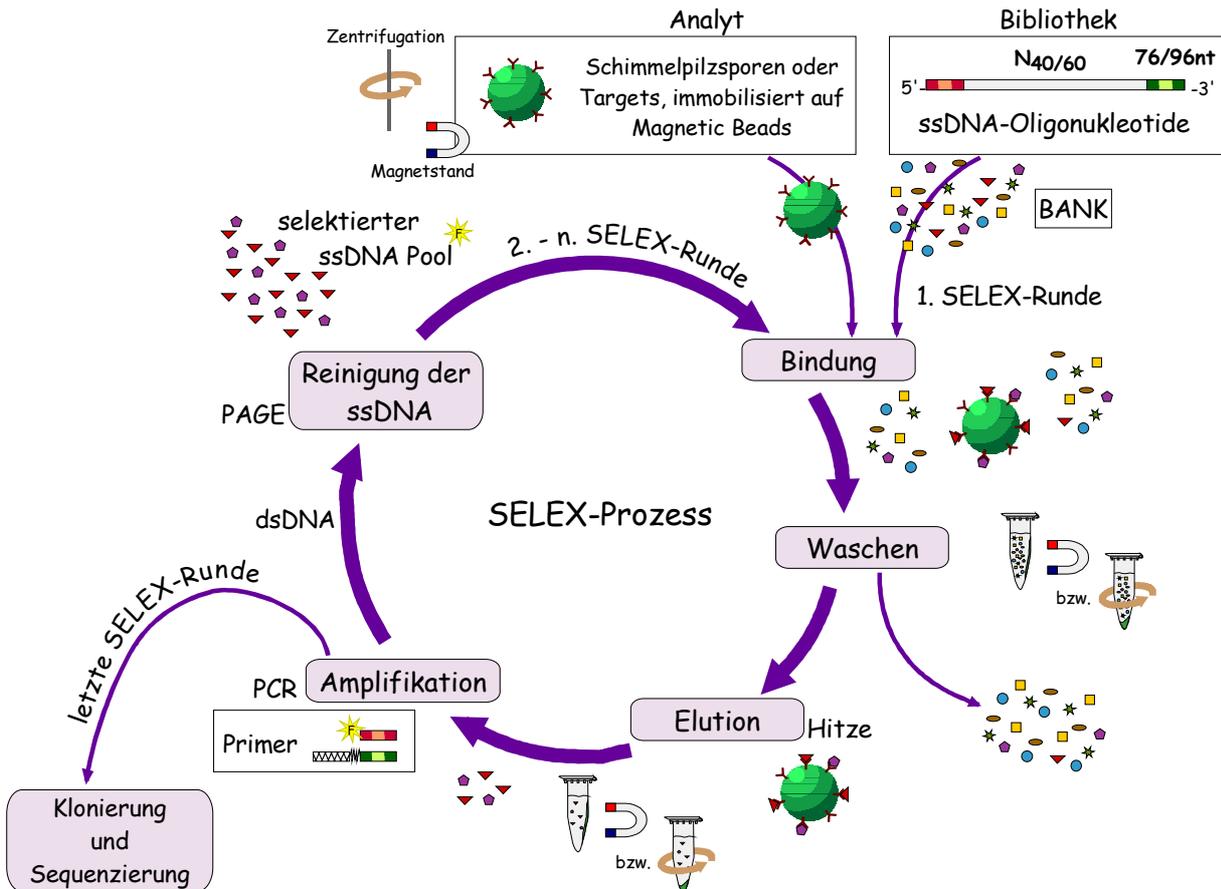


Abb. 4.1: Allgemeine Darstellung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von ssDNA-Aptameren (nach Stoltenburg & Strehlitz, 2003)

4.5.2 Oligonukleotid-Bibliothek und Primer

Ausgangspunkt jedes SELEX-Prozesses ist eine randomisierte ssDNA-Bibliothek. In Anlehnung an die Arbeiten von Crameri und Stemmer (Crameri & Stemmer, 1993) wurden zwei ssDNA-Bibliotheken mit Gesamtlängen von 96 Nukleotiden (BANK-A) bzw. 76 Nukleotiden (BANK-B) genutzt (siehe Abb. 4.3). Diese Bibliotheken bestehen aus Oligonukleotiden mit einem internen variablen Bereich von 60 (BANK-A) bzw. 40 (BANK-B) Nukleotiden, welcher am 5'- und am 3'-Ende von spezifischen Primerregionen flankiert wird. Diese definierten Regionen mit einer Länge von je 18 Nukleotiden dienen als Primerbindungsstellen für die PCR-Amplifikation. Die Bibliotheken wurden kommerziell von der Firma Invitrogen GmbH bezogen (chemische Synthese, PAGE gereinigt). Die Variabilität der beiden Banken liegt bei der eingesetzten Menge von ~ 2 nmol bei theoretisch 10^{15} verschiedenen Molekülen.

Für die PCR wurden neben den unmodifizierten Primern AP10 und AP20 weitere Primer mit speziellen Modifikationen am 5'- oder am 3'-Ende eingesetzt. (siehe Abb. 2.3) Die 5'-Fluorescein-Modifikation (Primer AP60) diente der Fluoreszenzmarkierung des (+)DNA-Stranges für dessen Identifizierung und Quantifizierung. Zur Reinigung von ssDNA aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt wurden die Primer TER-AP20 und AP20Ribo genutzt. Die Verwendung dieser Primer für den (-)Strang gestattete eine Trennung der Stränge nach Größenunterschied, der für die Aufreinigung genutzt wurde (siehe Kap. 4.5.4). Die 5'-Biotin-

Modifikation (Primer AP10Bio) war zur Immobilisierung der Oligonukleotide auf Oberflächen (Magnetic Beads, IAsys-Probenküvette, siehe Kap. 4.8.1 und 4.8.3) nötig. Alle Primer wurden kommerziell von Invitrogen GmbH oder IBA GmbH bezogen (chemische Synthese, HPLC gereinigt).

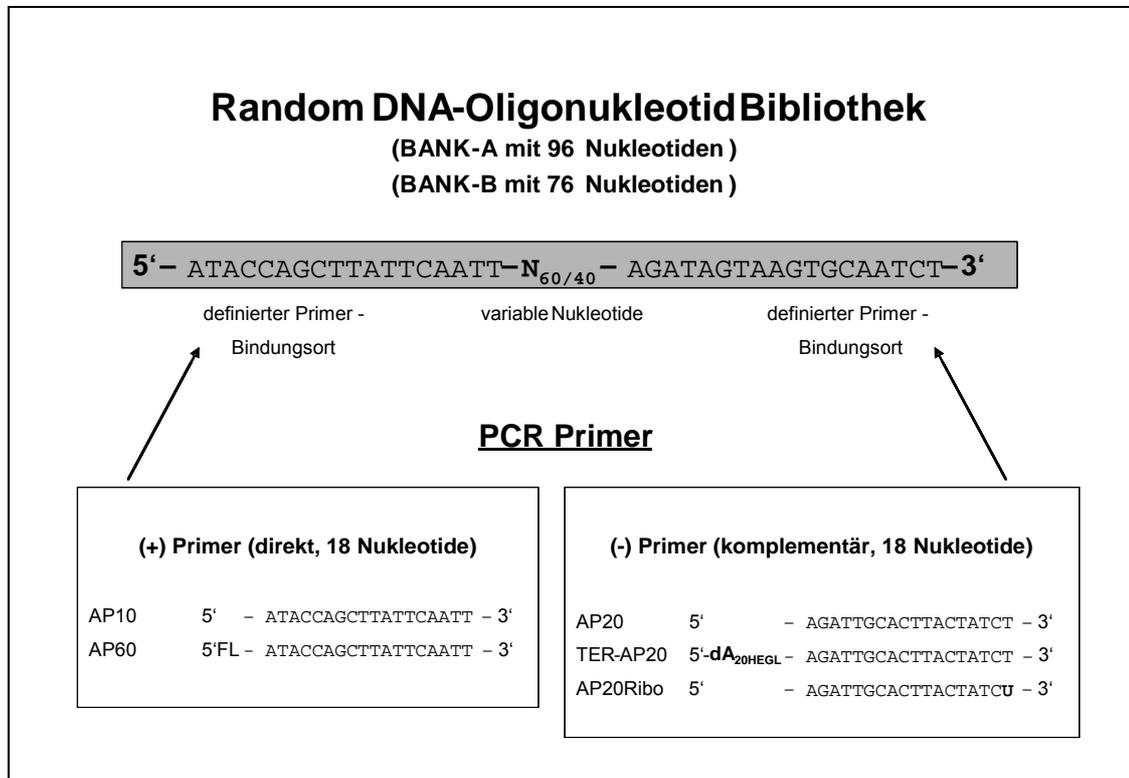


Abb. 4.2: Aufbau der random DNA-Oligonukleotidbank (BANK-A bzw. BANK-B) mit verwendeten Primern

Primermodifikationen: **FL** - Fluorescein
dA₂₀HEGL - 20x Adenin und Hexaethylenglykol-Spacer
U - Ribosemolekül mit Uracil
Bio - Biotin

4.5.3 Targets

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Targets im SELEX-Prozess eingesetzt, um spezifische DNA-Aptamere zu selektieren. Einerseits wurden Versuche mit komplexen Targets durchgeführt. Dazu zählten intakte, verschieden vorbehandelte Schimmelpilzsporen und die löslichen Sporenbestandteile nach Aufschluss der Konidien. Zum anderen wurde mit definierten Einzelsubstanzen, wie Laminarin und Ethanolamin gearbeitet. Lösliche Zielmoleküle wurden dabei auf Magnetic Beads immobilisiert.

4.5.3.1 Intakte Schimmelpilzsporen

Zunächst fanden vollständige, verschieden vorbehandelte Konidien von *Aspergillus versicolor* und *Penicillium expansum* Anwendung (siehe Kap. 4.2.2) als Target im SELEX-Prozess.

Die Schimmelpilzsporen wurden entweder 15 min bei 80 °C (Thermomixer 1000 rpm) in Bindungspuffer inkubiert oder für 4,5 h bei 37 °C unter Schütteln (1000 rpm) in 2 % Malzextrakt vorgequollen.

Zum Einsatz kamen in jeder SELEX-Runde $\sim 10^8$ neue, frisch vorbehandelte Sporen. Die Abtrennung der Sporen vom umgebenden Puffermedium erfolgte jeweils mittels einer milden Zentrifugation (1,5 min, 5000 rpm, RT).

4.5.3.2 Lösliche Sporenfraktion

Sollten die löslichen Sporenbestandteile oder definierte Einzelsubstanzen als Zielmoleküle im SELEX eingesetzt werden, war deren Abtrennung vom umgebenden Puffermedium nicht durch Zentrifugation möglich. Diese Targets wurden daher auf eine feste Matrix immobilisiert. Als Trägermaterial wurden magnetische Beads der Firma Dynal Biotech GmbH (Hamburg) ausgewählt. Es handelt sich dabei um einheitliche, paramagnetische Polystyren-Beads. Ihr Durchmesser beträgt $2,8 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ bei einem Eisengehalt von 12–15 %. Die Beads (siehe Abb. 4.2) werden mit verschiedenen, auf der Oberfläche gebundenen, funktionellen Gruppen angeboten.

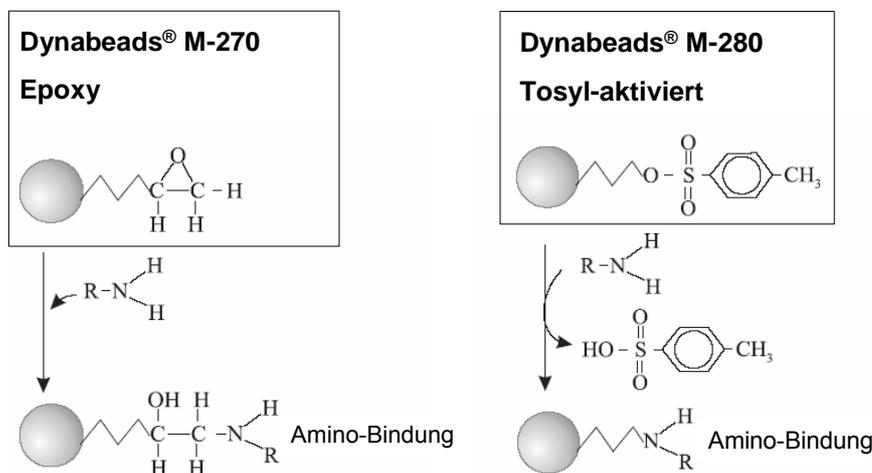


Abb. 4.3: Epoxy- und Tosyl-Beads mit Reaktionsschema der Immobilisierung

(aus: Product Information, Surface Activated Dynabeads®, Dynal Biotech, www.dynalbiotech.com)

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Beads handelt es sich zum einem um Dynabeads M-270 Epoxy (im Weiteren: Epoxy-Beads) und zum anderen um Dynabeads M-280 Tosylactivated (im Weiteren: Tosyl-Beads). Bei den Epoxy-Beads sind funktionelle Epoxy-Gruppen auf der Oberfläche der Beads fixiert. Die Tosyl-Beads werden vom Hersteller durch Reaktion der Hydroxylgruppen mit p-Toluensulfonylchlorid hergestellt. Die Immobilisierung der Targets an die Beads erfolgte über die in den Zielmolekülen vorhandenen Amino- bzw. Hydroxylgruppen.

Um die Beads vom sie umgebenden Puffermedium zu trennen, wurden sie in einen speziellen, magnetischen Separationsständer gebracht, in dem die Beads innerhalb von ~ 1 min im magnetischen Feld an die Wand des Reaktionsgefäßes gezogen werden. Die Pufferlösung kann nun problemlos abgetrennt werden.

Zur Herstellung der löslichen Sporenfraktion wurden *Penicillium expansum*-Sporen mittels Kugelmühle aufgeschlossen (siehe Kap. 4.2.3). Nach Abtrennung der festen Bestandteile lag die lösliche Fraktion in PBS, pH 7,35 + 1 % Protease-Inhibitor (Protease-Hemmer-

Cocktail für Pilze/Hefen, Sigma) vor. Diese wurde entsprechend der Herstellerangaben auf Epoxy-Beads immobilisiert (User Manual Dynal).

Die Epoxy-Beads wurden zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer Endkonzentration von 2×10^9 Beads/mL aufgenommen. Aliquots zu 5×10^8 Beads wurden entnommen und zweimal 10 min mit je 1 mL 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 im Thermomixer (1200 rpm) bei RT gewaschen. Jedes Aliquot wurde mit 900 μ L Immobilisierungslösung versetzt ($\rightarrow 6 \times 10^8$ Beads / mL).

Immobilisierungslösung: 600 μ L lösliche Sporenfraktion (24–30 μ g Protein)
+ 300 μ L 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4

Die Immobilisierung erfolgte ÜN bei 37 °C unter ständigem Schwenken (400 rpm). Die Beads wurden danach dreimal für je 5 min in Bindungspuffer (5×10^8 Beads/mL) im Thermomixer (1200 rpm) bei RT gewaschen. Anschließend wurden je 5×10^8 Beads in 1 mL Bindungspuffer gegeben und unter Schwenken 4,5 h inkubiert. Das im Bindungspuffer enthaltene Tris(hydroxymethyl)-aminomethan blockierte dabei die noch nicht besetzten Bindungsstellen der Epoxy-Beads.

Zum Vergleich wurden so genannte ‚Negativ-Beads‘ nach dem gleichen Protokoll hergestellt. Als Immobilisierungslösungen dienten hier pro 5×10^8 Beads, 600 μ L PBS, pH 7,35 + 1 % Protease-Inhibitor und 300 μ L 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4.

Die modifizierten und gewaschenen Beads wurden in Bindungspuffer überführt, mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop (BX60, Olympus) gezählt und bei 4 °C gelagert. Pro SELEX-Runde kamen 1×10^8 Beads zum Einsatz.

4.5.3.3 Laminarin

Laminarin ist ein β -1,3-Glucan, welches aus *Laminaria digitata*, einer Braunalge, gewonnen wird. Nach Literaturrecherche (siehe Kap. 1.3.1.4) wurde festgestellt, dass Laminarin den in Schimmelpilzen vorkommenden β -1,3-Glucanen der Zellwand sehr ähnlich ist. Daher wurde es als definiertes Target im SELEX-Prozess zur Anreicherung von Aptameren für Schimmelpilze ausgewählt.

Die Immobilisierung von Laminarin (SIGMA) auf Epoxy-Beads erfolgte im stark basischen Milieu in Anlehnung an das Protokoll von Douwes *et al.* (Douwes *et al.*, 1996).

Die Epoxy-Beads wurden vorbehandelt, wie in Kapitel 4.5.3.2 beschrieben. Die Immobilisierung von je 5×10^8 Beads erfolgte in 900 μ L der folgenden Immobilisierungslösung.

Immobilisierungslösung: 16,7 mg Laminarin in 10 mL 0,1 M NaOH / PBS (2 : 1), pH 12

Immobilisiert wurde ÜN unter ständigem Schwenken (400 rpm) bei 37 °C. Nach zwei zehnerminütigen Waschschritten in PBS, pH 7,35 wurden die Beads zum Blockieren der freien Bindungsstellen mit 1 M Ethanolamin oder 0,5 % BSA behandelt (1 mL/ 5×10^8 Beads, ÜN, 37 °C, unter Schwenken, 400 rpm). Beide Blockierungssubstanzen waren dabei in PBS, pH 7,35 gelöst.

Die entsprechenden ‚Negativ-Beads‘ wurden in gleicher Weise, unter Verwendung der jeweiligen Blockierungssubstanz, hergestellt (1 mL 1 M Ethanolamin oder 0,5 % BSA pro 5×10^8 Beads, kein Laminarin in den Immobilisierungslösungen).

Nach der Immobilisierung wurden die modifizierten Beads mindestens fünfmal mit Bindungspuffer gewaschen ($1\text{ mL}/5 \times 10^8$ Beads) und anschließend ausgezählt (siehe Kap. 4.5.3.2). Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls in Bindungspuffer bei $4\text{ }^\circ\text{C}$. Für jede SELEX-Runde wurden 1×10^8 dieser Laminarin-Beads eingesetzt.

Laminarin-Nachweis

Zum Nachweis der auf den Beads gebundenen Laminarinmengen erfolgte über Vergleichsmessungen der Laminarinkonzentrationen in den Immobilisierungslösungen vor und nach der Immobilisierung. Das Laminarin wurde dazu durch Laminarinase (SIGMA) enzymatisch in seine einzelnen Glucosemoleküle aufgespalten. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Zugabe von $15\text{ }\mu\text{L}$ 1 M Essigsäure zu je $180\text{ }\mu\text{L}$ der Immobilisierungslösungen zur Neutralisation
- Zugabe von $205\text{ }\mu\text{L}$ 50 mM Na-Acetat, pH 5,0
- Zugabe von je $100\text{ }\mu\text{L}$ Enzymlösung (1 U/mL)
- Inkubation 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln bei 1000 rpm (Thermomixer)
- Stoppen der Reaktion: 10 min bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln bei 1000 rpm (Thermomixer)

Der Glucosegehalt wurde anschließend mit einem Glucosesensor (SensLab GmbH) mittels Handmessgerät (SensLab 1A, SensLab GmbH) bestimmt. Dieser elektrochemische Biosensor arbeitet auf Grundlage der enzymatischen Umsetzung von Glucose durch das Enzym Glucoseoxidase. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird an der integrierten Elektrode amperometrisch erfasst.

Der Vergleich mit definierten Standardkonzentrationen von Laminarin ($5, 10, 50, 100, 300\text{ }\mu\text{g/mL}$) zeigte, dass die eingesetzte Menge an Laminarin gleich der am Sensor gemessenen Menge an Glucose ist. Somit war eine Kontrolle der Beladung durch einfache Subtraktion der vor und nach der Immobilisierung gefundenen Laminarinmengen möglich.

Die Beladung der Epoxy-Beads mit Laminarin wurde nach jeder Immobilisierungsprozedur bestimmt. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass $\sim 20\text{ }\mu\text{g}$ Laminarin pro 10^8 Beads gebunden werden.

4.5.3.4 Ethanolamin

Für die Immobilisierung von Ethanolamin wurden sowohl Epoxy-, als auch Tosyl-Beads eingesetzt. Die Vorgehensweise war für beide Arten an Beads die gleiche, mit dem einzigen Unterschied, dass Tosyl-Beads nicht wie Epoxy-Beads in DMSO aufgenommen (siehe Kap. 4.5.3.2), sondern in einer Konzentration von 2×10^9 Beads/mL in Puffer vom Hersteller geliefert werden. Nach dem Vorwaschen mit $0,1\text{ M}$ Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4 (siehe Kap. 4.5.3.2) wurden die Beads mit 1 M Ethanolamin in PBS, pH 7,35 (1 mL zu je 5×10^8 Beads) ÜN unter ständigem Schwenken, 400 rpm , bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ immobilisiert. Im Anschluss an die Immobilisierung wurde mindestens fünfmal mit je 1 mL Bindungspuffer pro 5×10^8 Beads gewaschen und anschließend gezählt (siehe Kap. 4.5.3.2). Bis zu ihrer Verwendung wurden die Beads im Kühlschrank bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ in Bindungspuffer gelagert. In den entsprechenden SELEX-Runden kamen 1×10^8 der Ethanolamin-Beads zum Einsatz.

4.5.4 Durchführung des SELEX-Prozesses

Vorbereitende Schritte

Die Zielmoleküle (Sporen oder auf Beads immobilisiert) wurden vor Beginn jeder SELEX-Runde 5–8x mit je 500 µL Bindungspuffer gewaschen. Die Abtrennung der Targetmoleküle erfolgte im Falle der Schimmelpilzsporen durch Zentrifugation (1,5 min bei 5000 rpm, RT) bzw. im Magnetstand, wenn Magnetic Beads als Träger der Targetmoleküle eingesetzt wurden. Beim letzten Waschschriff wurden die Zielmoleküle bzw. Beads in einer Neubauer-Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop gezählt. In der Regel kamen 10^8 Partikel (Sporen oder Beads) für jede SELEX-Runde zum Einsatz.

Parallel zu den Waschschriffen wurde die ssDNA (DNA-Bindungslösung) thermisch equilibriert, um eventuelle inter- oder intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen DNA-Strängen aufzulösen. Dazu wurde die ssDNA 10 min bei 90 °C im Thermomixer (1000 rpm) geschüttelt, anschließend 15 min auf Eis und 5–15 min bei RT inkubiert.

Alle Arbeiten mit ssDNA wurden in silikonisierten Eppendorfgefäßen und mit silikonisierten Pipettenspitzen durchgeführt, um unspezifische Adsorption der ssDNA an Kunststoffoberflächen zu minimieren.

Bindungsreaktion

In der Bindungsreaktion wurden die ssDNA und das Target unter geeigneten Bedingungen zusammengeführt.

Eingesetzt wurden in jedem SELEX-Prozess in der 1. Runde 2 nmol der randomisierten ssDNA-Bibliothek und ab der 2. Runde der gesamte ssDNA-Pool der Vorrunde (~200 pmol), gelöst in 500 µL Bindungspuffer. Zusammen mit je 10^8 der jeweiligen Target-Partikel erfolgte die Bindung für 30 min bei 21 °C im Thermomixer unter Schütteln (800–1200 rpm).

Nach der Bindungsreaktion wurde die ungebundene ssDNA abgenommen (Nichtbinderfraktion).

Waschen

Zur Separation gebundener von ungebundener DNA, wurde der ssDNA-Target-Komplex mindestens fünfmal mit je 500 µL Bindungspuffer gewaschen. Die einzelnen Waschraktionen wurden gesammelt.

Elution

Die Trennung der gebundenen ssDNA vom Zielmolekül erfolgte mittels Hitze- oder Affinitätselution. Für die Hitzeelution wurde der ssDNA-Target-Komplex in 50–400 µL Bindungspuffer aufgenommen und 2x für je 7 min bei 80 °C im Thermomixer (1200 rpm) inkubiert.

Affinitätselutionen fanden statt, indem entweder Laminarin (2 µg/µL) oder Proteine aufgeschlossener *Penicillium expansum*-Sporen (~500 µg/mL; siehe Kap. 4.2.3), gelöst in 200–400 µL Bindungspuffer, zugegeben wurden. Eluiert wurde dann 30 min bei 21 °C bei 1200 rpm (Thermomixer).

Die eluierte ssDNA (Eluat) wurde gesammelt und falls nötig mit Ethanol präzipitiert (siehe Kap. 4.3.2), um sie in ein geringeres Volumen (100–200 µL) Bindungspuffer zu überführen.

Quantifizierung der ssDNA der einzelnen SELEX-Fractionen

Alle in einer SELEX-Runde erhaltenen Fractionen (DNA-Bindungslösung, Nichtbinderfractionen, Waschfractionen und Eluate) wurden über eine Fluoreszenzmessung im Multilabel Counter quantifiziert (siehe Kap. 4.3.1). Dies erfolgte ab der 2. SELEX-Runde direkt, da die ssDNA hier bereits am 5'-Ende mit Fluorescein markiert war. In der ersten SELEX-Runde war es notwendig, einen speziellen Fluoreszenzfarbstoff einzusetzen (OliGreen™; siehe Kap. 4.3.1). In beiden Fällen wurde die DNA Menge in den einzelnen SELEX-Fractionen mittels einer Kalibrierkurve bestimmt. Diese Kalibrierkurven wurden für jeden Messtag neu aufgenommen, unter Verwendung von Nichtbinderfraction oder ssDNA-Bibliothek in definierten Konzentrationen.

Amplifikation

Die Amplifikation der eluierten, selektierten ssDNA jeder Runde erfolgte nach deren Quantifizierung im präparativen Maßstab (15 PCR-Ansätze zu je 100 µL).

Dabei wurde mit zwei verschiedenen *Taq* DNA Polymerasen und deren zugehörigen Puffersystemen gearbeitet.

- *Taq* DNA Polymerase (PROMEGA); 10x Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9]; 1 % Triton); 25 mM MgCl₂
- HOTFire Polymerase (SOLIS BIODYNE); 10x Buffer B (800 mM Tris/HCl [pH 9,4], 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2 % Tween20); 25 mM MgCl₂

Die PCR-Ansätze wurden in beiden Fällen in gleicher Art und Weise zusammengegeben und die PCR unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt. Beim Einsatz der HOTFire-Polymerase (SOLIS BIODYNE-System) war allerdings eine längere Denaturierungszeit (15 min, 94 °C) nötig, um die Polymerase zu aktivieren und den Amplifikationsvorgang zu starten (siehe Tab. 4.1).

Wurde mit dem PROMEGA-System gearbeitet, so wurde die Polymerase separat erst nach einem fünfminütigen Denaturierungs-Schritt bei 94 °C zugegeben. Durch Verwendung dieser Hot-Start-Methoden wurden unspezifische Hybridisierungen in der Vorheizphase vermieden.

Als PCR-Primer wurden 5'-modifizierte Primer verwendet (siehe Kap. 4.5.2). Zum einen erfolgte somit eine Fluoreszenz-Markierung des (+)Stranges und zum anderen ermöglichte die Modifizierung des (-)Stranges eine Auftrennung der doppelsträngigen PCR-Produkte nach ihrer Größe (siehe unten). Als Negativkontrolle diente ein halber PCR-Ansatz (50 µL), dem kein Template zugegeben wurde. Eine positive Kontrolle wurde unter Verwendung von 1 ng DNA der Nichtbinderfraction in 50 µL Ansatz hergestellt. Die Kontrollansätze wurden unter denselben PCR-Bedingungen amplifiziert, wie die übrigen Proben.

Die elektrophoretische Kontrolle der erhaltenen PCR-Produkte wurde in einem 2 %igen DNA-Agargel (DNA Agar [MBI] SERVA) + Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) durchgeführt. Als Größenvergleich diente ein DNA-Marker 0,05 µg/µL in GLB[B/X/O] (10 µL/Slot, 25 bp DNA Ladder, GIBCO BRL). Je 2 µL des PCR-Ansatzes wurden mit je 8 µL GLB[O] versetzt und in die Probetaschen gegeben. Der Gellauf wurde für 1 h bei 100 V im Agargel Standard von Biometra durchgeführt (siehe Kap. 4.3.3).

Tab. 4.1: PCR-Komponenten und -Bedingungen während des SELEX-Prozesses

PCR Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen pro Ansatz (100 µL)	Konzentration im Ansatz (100 µL)
(+)Primer	100 µM	1 µL	1 µM
(-)Primer	100 µM	1 µL	1 µM
dNTP	5 mM	4 µL	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	7,6 µL	1,9 mM
Puffer	10x	10 µL	1x
Polymerase	5 U/µL	1 µL	5 U
selektierte ssDNA / reinst Wasser		75,4 µL	

PCR Schritte	Temperatur	Zeit	
		PROMEGA	SOLIS BIODYNE
Vorheizen	80 °C		
Denaturierung/ Polymeraseaktivierung	94 °C	5min	15 min
Pause	80 °C	Zugabe der <i>Taq</i> Polymerase	
Denaturierung	94 °C	1 min	} 30x
Annealing	47 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
A-Überhang	72 °C	10 min	
Kühlen	4 °C		

Nach Beendigung der PCR erfolgte die Aufbereitung der PCR-Proben für eine Weiterbehandlung. Dazu wurden die Ansätze zunächst in Aliquots zu je 400 µL gepoolt und mit Ethanol gefällt (siehe Kap. 4.3.2). Die gefällte DNA wurde in TE-Puffer, pH 7,4 aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt (100 µL dsDNA in TE-Puffer, pH 7,4).

Reinigung der relevanten ssDNA

Zur Auftrennung der doppelsträngigen PCR-Produkte und Gewinnung des relevanten (+)Stranges für die nächste SELEX-Runde, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. In beiden Fällen wurde durch die Verwendung geeigneter (-)Primer (siehe Kap. 4.5.2) ein Größenunterschied zwischen beiden DNA-Strängen erzeugt und dieser für eine Auftrennung genutzt. Die grundsätzliche Funktionsweise der beiden Methoden erklärt Abbildung 4.4.

Nach der Trennung der beiden Stränge auf Grund ihrer Größe in einer denaturierenden PAGE (siehe Kap. 4.3.3) wurde der relevante (+)Strang mittels Gelelution (siehe Kap. 4.3.4) aus dem Gel zurück gewonnen.

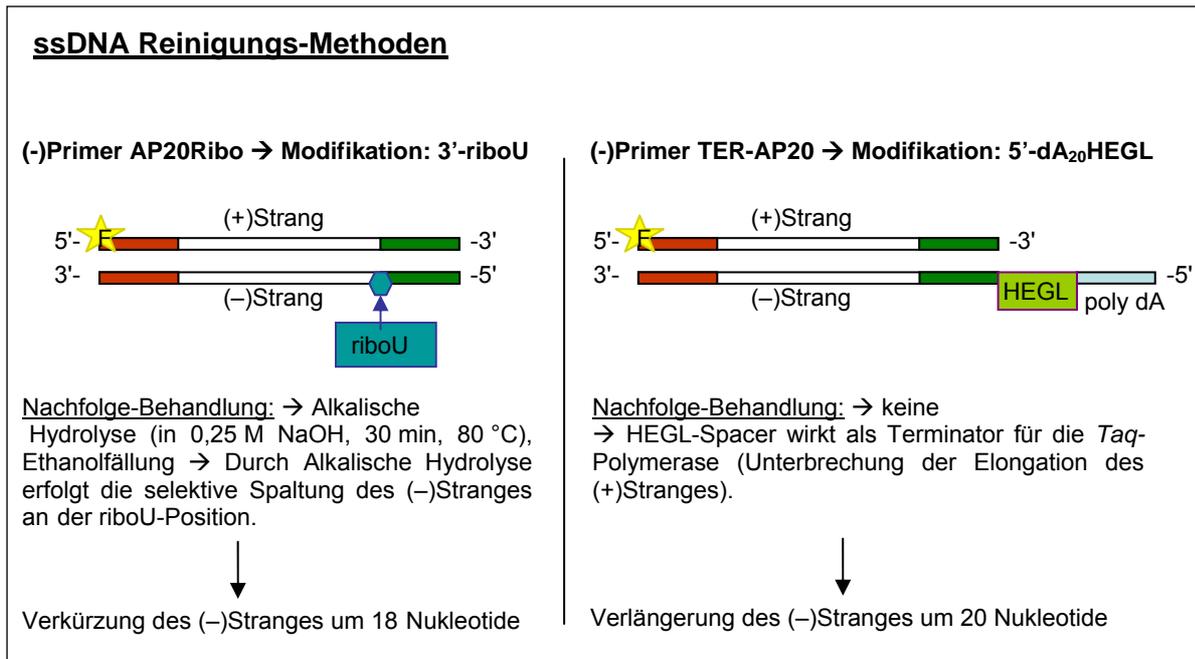


Abb. 4.4: Methoden zur Reinigung relevanter ssDNA aus PCR-Produkten

In den ersten SELEX-Runden wurde grundsätzlich mit der Methode unter Einsatz des Primers TER-AP20 gearbeitet. Fand bereits eine Anreicherung spezifischer Oligonukleotide in späteren Runden (ab 6. Runde) statt, wurde die Methode mit Primer AP20Ribo und anschließender Alkalischer Hydrolyse angewendet.

Im Ergebnis beider Methoden lag der angereicherte ssDNA-Oligonukleotidpool für die nächste SELEX-Runde in 500 µL Bindungspuffer vor.

Modifikation des SELEX-Prozesses

Zur Reduktion der Koselektion von Target-unspezifischer ssDNA wurden in der Regel vor den SELEX-Runden, in denen Bead-gebundenes Target zum Einsatz kam, Negativ-selektionen vorgeschaltet. Die Herstellung der so genannten Negativ-Beads ist in den Kapiteln 4.5.3.2 (Beads mit Proteasehemmer) und 4.5.3.3 (Beads mit Blockierungssubstanzen Ethanolamin oder BSA) beschrieben. Mit diesen Negativ-Beads wurde die DNA-Bindungslösung 15 min bei 21 °C, 1000 rpm, präinkubiert (Einsatz je 10⁸ Negativ-Beads pro Runde). Die nicht durch die Negativ-Beads gebundene ssDNA wurde dann zur eigentlichen Bindung mit dem Target gebracht.

Die auf den Negativ-Beads gebundene ssDNA wurde anschließend mit Hitze eluiert (2x 7 min bei 80 °C, 1200 rpm) und quantifiziert, um den Anteil unspezifisch angereicherter ssDNA zu bestimmen.

Die letzte SELEX-Runde

Im Falle einer erfolgreichen Anreicherung Target-spezifischer ssDNA (Aptamere) nach mehreren SELEX-Runden wurde die DNA für eine Klonierung in einen geeigneten Vektor vorbereitet. Dazu wurde in der letzten SELEX-Runde eine PCR mit unmodifizierten Primern (AP10 und AP20, siehe Kap. 4.5.2) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren gleich denen der vorhergehenden SELEX-Runden (siehe Tab. 4.1). Die PCR-Produkte wurden kloniert und individuelle Aptamerklone analysiert.

4.6 Klonierung selektierter Aptamer-DNA

4.6.1 Klonierung selektierter DNA nach der letzten SELEX-Runde

Für die Klonierung spezifischer ssDNA wurden die PCR-Produkte der letzten SELEX-Runde in einen Klonierungsvektor eingebracht und in *E.coli* transformiert. Hierfür wurde das TOPO TA Cloning Kit von INVITROGEN (#K4500-01) gewählt, welches für die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhang ausgelegt ist. Dabei wurde die Eigenschaft der Taq Polymerase genutzt, als terminale Transferase zu fungieren und Template-unabhängig ein einzelnes Deoxyadenosin (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte zu addieren. Somit wird eine direkte Insertion dieser in den linearisierten und mit einem 3'-T-Überhang (Thymidin) modifizierten Vektor (pCR2.1-TOPO) mittels Topoisomerase möglich. (Abb. 4.5)

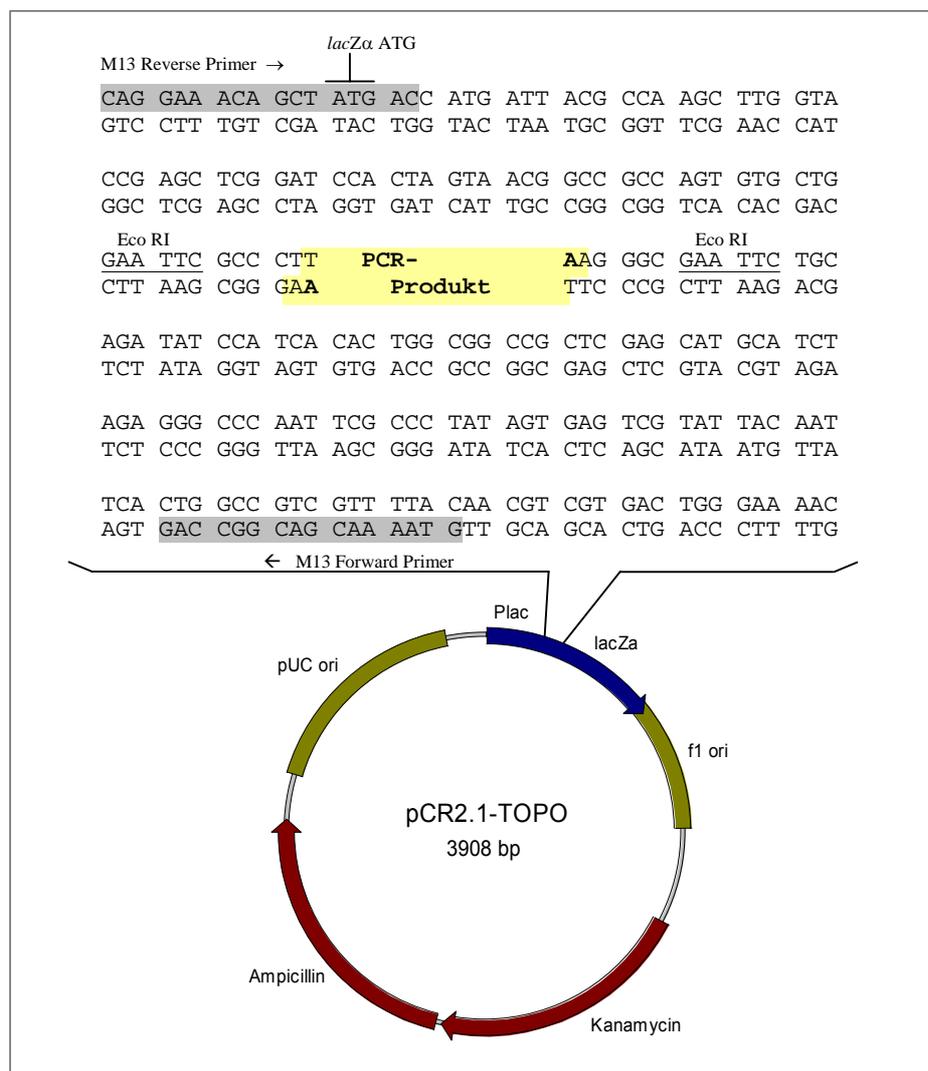


Abb. 4.5: Vektorkarte von pCR2.1-TOPO mit Multicloning Site

Dargestellt ist der Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO mit den Resistenzgenen, welche für eine Ampicillin- oder Kanamycinresistenz kodieren (Rot), die Replikationsorigin (Grün) und das lacZ-Gen (Blau). In diesem Bereich findet sich auch die Multicloning Site, die zum Teil vergrößert im oberen Bereich der Abbildung dargestellt ist. Zwischen den M13-Forward- und -Reverse-Primerbindungsstellen (Grau) befinden sich eine Vielzahl von Spaltstellen für verschiedene Restriktionsenzyme (u.a. für EcoR1) und der Klonierungsort für ein PCR-Produkt mit einem 3'-A-Überhang (Gelb).

4.6 Klonierung selektierter Aptamer-DNA

Die Klonierungsreaktion und Transformation wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Manual „TOPO TA Cloning“ *Version N*).

Die Klonierungsansätze wurden folgendermaßen erstellt:

Klonierungsansatz:	1 µL PCR-Produkt	} aus TOPO TA Cloning Kit
	1 µL Salzlösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	
	3 µL steriles A. bidest.	
	1 µL Vektor pCR2.1-TOPO	

Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Für die Transformation dienten chemisch kompetente *E.coli* DH5α-T1-Zellen (INVITROGEN GmbH). Dazu wurden 2 µL des Klonierungsansatzes zu 50 µL Zellen pipettiert und 10 min auf Eis gelagert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt. Nach einer Zugabe von 250 µL SOC-Medium (INVITROGEN GmbH) wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Aus jedem dieser Transformationsansätze wurden 1x 50 µL und 2x 100 µL auf Selektivplatten (LB Agar mit 50 µg/mL Kanamycin; Lennox L Agar, GIBCO BRL) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Vor der Transformation wurden auf die Selektivplatten außerdem je 40 µL X-Gal (40 mg/mL) aufgebracht, um später über ein „blue/white-screening“ positive Transformanten mit einem rekombinanten Plasmid zu identifizieren. Von 50 positiven (weißen) Transformanten wurden Ausstrichplatten (LB-Agar + 100 µg/mL Kanamycin) hergestellt.

Anlegen von Stammkulturen der einzelnen Transformanten

Um jederzeit eine Zugriffsmöglichkeit auf die Klone zu haben, die die monoklonalen Aptamere enthalten, wurden Glycerinstammkulturen der einzelnen Transformanten angelegt.

Für diesen Zweck wurden von den 50 positiven Klonen ÜN-Flüssigkulturen angesetzt. Dazu wurden 4 mL LB-Medium (Lennox L Broth Base, GIBCO BRL) mit Kanamycinzusatz (100 µg/mL) in ein Reagenzröhrchen gegeben. Inokuliert wurde jeder Ansatz mit Zellmaterial, welches mittels Impföse von den zuvor angelegten Ausstrichplatten entnommen wurde. Die Flüssigkulturen wurden ÜN im Schüttelinkubator (Edmund Bühler, KS-15 Control) bei 37 °C und 160 rpm inkubiert.

Die ÜN-Kulturen wurden mit sterilem Glycerin zu einer Endkonzentration von 10–15 % versetzt, 1 h bei RT inkubiert (Eindringen des Glycerins in die Zellen) und anschließend zur Stammhaltung bei -80 °C eingefroren.

Zur Reaktivierung wurden die Kulturen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in LB-Medium kultiviert.

4.6.2 Überprüfung der Transformanten mittels Kolonie-PCR

Nach einer Transformation ist es notwendig, die positiven Transformanten hinsichtlich der Korrektheit der Plasmid-DNA (pDNA) bzw. des eingebauten Inserts (PCR-Produkt) zu überprüfen. Für eine schnelle Analyse einer relativ großen Anzahl von Transformanten eignet sich die Kolonie-PCR (*Müller, 2001*). Bei dieser Art von PCR werden komplette Zellen eingesetzt. Durch die Erhitzung im ersten PCR-Schritt werden die Zellen aufgeschlossen,

die DNA freigesetzt und somit für die Polymerase zugänglich gemacht. Wichtig bei dieser Analyse ist die Wahl der Primer, die aus einer Kombination von Plasmid-spezifischem und Insert-spezifischem Primer bestehen sollte. Auf diese Weise liefern nur die Transformanten ein PCR-Produkt einer bestimmten Größe, die das Plasmid mit dem relevanten Insert enthalten. Außerdem kann die Einbaurichtung des Inserts bestimmt werden.

Von jedem Klon wurden zwei PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Primern bereitet. In jedem Ansatz wurde der Insert-spezifische Primer AP10 verwendet. Die Primer M13FOR bzw. M13REV entsprechen Regionen aus der Plasmid-DNA-Sequenz und flankieren den Einbaort des PCR-Produktes (siehe Abb. 2.5). Beide Primerkombinationen sind notwendig, um die Einbaurichtung des Inserts bestimmen zu können.

Mit einem sterilen Holzstab wurde etwas Zellmaterial der positiven Klone von den Ausstrichplatten (siehe Kap. 4.6.1) entnommen und direkt im vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne Zellmaterial. Danach wurde die PCR gestartet. (siehe Tab. 4.2) Der 10 min Denaturierungsschritt zu Beginn der PCR dient der Lyse der Zellen und Inaktivierung der Nukleasen.

Tab. 4.2: PCR-Komponenten und -Bedingungen für die Kolonie-PCR

PCR Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Volumen pro Ansatz (50 µL)	Konzentration im Ansatz (50 µL)
Primer AP10	100 µM	0,5 µL	1 µM
Primer M13FOR / M13REV	100 µM	0,5 µL	1 µM
dNTP	5 mM	2 µL	0,2 mM
MgCl ₂	25 mM	3,8 µL	1,9 mM
Puffer	10x	5 µL	1x
Polymerase	5 U/µL	0,5 µL	5 U
reinst Wasser		37,7 µL	
Template	Zellmaterial einer Kolonie		

PCR Schritte	Temperatur	Zeit
Vorheizen	80 °C	
Denaturierung / Zellyse	94 °C	10 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	47 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min
A-Überhang	72 °C	10 min
Kühlen	4 °C	

Zur Visualisierung und Bewertung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine Agar-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kap. 4.3.3). Die Elektrophorese fand in 2 % DNA-Agar statt. Je PCR-Ansatz wurden 4 µL Probelösung eingesetzt.

4.6.3 Präparation von pDNA

Die Präparation der Plasmid-DNA aus den gewonnenen positiven Klonen fand unter zwei Gesichtspunkten statt. Zum einen war eine sehr reine pDNA für die Sequenzierung notwendig. Für diese Präparationen wurde der ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘ (QIAGEN) verwendet. Zum anderen musste relativ viel pDNA für die weitere Aufarbeitung der relevanten ssDNA (Aptamere) präpariert werden. Hierfür wurde eine von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 2001) beschriebene Methode der alkalischen Lyse genutzt.

pDNA-Präparation mittels ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘

Zur Präparation sehr reiner pDNA wurde das ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘ der Firma QIAGEN eingesetzt. Dieses Kit arbeitet nach der Methode der alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Reinigung der DNA durch Absorption an einer Silicat-Membran.

Zunächst wurde von jedem Klon eine ÜN-Flüssigkultur in 4 mL LB-Medium + Kanamycin (100 µg/mL) angesetzt (siehe Kap. 4.6.1). Die Flüssigkulturen wurden ÜN (<16 h) im Schüttler [Schüttelinkubator: Edmund Bühler (TH15) KS-15 Control] bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Die Plasmid-DNA-Reinigung fand gemäß der Gebrauchsanweisung von QIAGEN statt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Membran erfolgte in 50 µL ‚AE buffer‘ (5 mM Tris/HCl, pH 8,5; aus dem Kit). Anschließend wurde die Konzentration mittels OD-Messung bestimmt (siehe Kap. 4.3.1). Zur Kontrolle der präparierten pDNA wurde eine Gelelektrophorese in 0,8 % DNA-Agar durchgeführt (siehe Kap. 4.3.3). Dazu wurden je 1 µL der pDNA-Lösung mit 8 µL Gel Loading Buffer GLB[O] versetzt.

Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

pDNA-Präparation nach Sambrook *et al.* (2001)

Die Präparation von größeren Mengen an pDNA aus *E.coli*-Transformantenzellen erfolgte in Anlehnung an die von Sambrook *et al.* (Midipräparation von pDNA aus *E.coli*, Sambrook *et al.*, 2001) beschriebene Methode der alkalischen Lyse. Zunächst wurde von jedem Klon 10 mL einer ÜN-Kultur in LB-Medium mit 100 µg/mL Kanamycin angelegt (Bebrütung 37 °C, 180 rpm, >16 h). Angeimpft wurde mit 100 µL der jeweiligen Glycerinstammkultur (siehe Kap. 4.6.1). Die Zellernte fand durch Zentrifugation der ÜN-Kultur bei 4630 x g für 10 min bei RT statt (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in 200 µL Lysemedium aufgenommen (25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Na-EDTA; 50 mM Glucose), gut homogenisiert und anschließend 20 min im Eisbad inkubiert. Danach wurden 450 µL alkalische SDS-Lösung (1 % SDS, 0,2 M NaOH) hinzugefügt und die Lösung durch mehrmaliges Kippen des Reaktionsgefäßes gemischt. Eine weitere Inkubation im Eisbad für 5 min folgte. Nach Zugabe von 350 µL 3 M Natriumacetat [pH 4,8] und sanftem Mischen durch Kippen des Reaktionsgefäßes wurde erneut für 20 min im Eisbad inkubiert.

Um chromosomale DNA, RNA und Proteine aus dem Lysat abzutrennen, wurde die Lösung 15 min bei 18500 x g, RT zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde zum Überstand 1 Volumen Isopropanol zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation (10 min, 9300 x g, RT) wurde verworfen und das Pellet in 500 µL TE-Puffer [pH 8,0] unter Zusatz von 20 µg/mL RNase A aufgenommen (Entfernung noch vorhandener RNA). Das Pellet wurde leicht aufgelockert und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zu

diesem Ansatz wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gegeben und gemischt (Protein-entfernung). Nach einer Zentrifugation bei 9300 x g für 10 min bei RT wurde die obere wässrige Phase abgenommen und diese ein weiteres Mal mit Phenol/Chloroform behandelt. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) wurde zur wässrigen Phase 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (1:1) gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 2 Volumen 96% Ethanol vermischt. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei RT und anschließend eine Zentrifugation bei 13500 x g bei 4 °C für 20 min. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol bei RT gewaschen und 10 min bei 13500 x g, 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf) für 10 min getrocknet. Die gewonnene pDNA wurde in 50 µL Tris/HCl [pH 8,5] aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung und Visualisierung der präparierten pDNA erfolgte wie oben beschrieben.

4.7 Sequenzanalyse individueller Aptamerklone

4.7.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung der relevanten pDNA, speziell der klonierten PCR-Fragmente, erfolgte als Auftragssequenzierung bei der Firma AGOWA GmbH (Berlin). Je Aptamerklon wurden 6 µg der entsprechenden pDNA verschickt, die mittels ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘ (QIAGEN, siehe Kap. 4.6.3) präpariert worden waren. Durchgeführt wurde die Einzelstrang-Sequenzierung des relevanten Aptamerstranges mit Hilfe des Universalprimers M13-24 Forward. Zur Kontrolle der erhaltenen Sequenzen wurden anschließend auch ausgewählte Gegenstränge sequenziert.

4.7.2 Sequenz- und Strukturanalyse

Aus den erhaltenen Plasmid-Sequenzen der verschiedenen Klone konnte die relevante Aptamersequenz anhand der bekannten Primer-Bindungsstellen eindeutig identifiziert und mit Hilfe des Programms Vector NTI Suite 8 (InforMax Inc.) bearbeitet werden.

Die Analyse der Primärstruktur enthält die Bestimmung der Größe und Basenzusammensetzung, sowie Vergleiche der Sequenzen verschiedener Klone, um mögliche konservierte Bereiche zu finden. Hierzu wurden zusätzlich frei zugängliche Tools im Internet genutzt (CLUSTAL W; DNAsis, Version 2.5; Hitachi)⁵.

Die Analyse der Sekundärstruktur ausgewählter Aptamere erfolgte über das ebenfalls im Internet zur Verfügung stehende Programm *mfold* (Version 3.1)⁶. Dieses Programm von Zuker (Zuker, 2003) berechnet die mögliche Faltung einzelsträngiger DNA durch eine Energie-Minimierungsmethode unter der Berücksichtigung von Haarnadelstrukturen und Blasen (Stems, Loops und Bulges).

⁵ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> [gelesen 08.01.2007]

⁶ <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/dna/form1.cgi> [gelesen 08.01.2007]

4.8 Bindungsversuche mit individuellen Aptameren

Zur Feststellung des Bindungsverhaltens der individuellen Aptamerklone fand eine Reihe von verschiedenen Bindungsexperimenten statt. Einerseits wurde die Bindungsreaktion gemäß den SELEX-Bedingungen (siehe Kap. 4.5.4) durchgeführt, wobei das Target an Magnetic Beads immobilisiert wurde. Die Elution des gebundenen, fluoreszenzmarkierten DNA-Aptamers erfolgte dann mittels Hitze oder als Affinitätselution.

Andererseits wurden verschiedenen Versuche, wie z.B. Messungen am IAsys-Biosensor oder Experimente zur Affinitätsreinigung durchgeführt, um die spezifische Bindung der selektierten Aptamere an ihre Zielmoleküle nachzuweisen.

4.8.1 Bindungsversuche mit immobilisiertem Target

Die Bindungsversuche mit immobilisierten Targets fanden für die Charakterisierung des Bindeverhaltens individueller Aptamerklone sowohl für Ethanolamin, als auch für die löslichen Sporenbestandteile statt. Die Immobilisierung der Targets an Magnetic Beads erfolgte dafür wie in den Kapiteln 4.5.3.2 und 4.5.3.4 beschrieben. Die Versuche verliefen nach dem gleichen Prinzip wie die Bindungs- und Hitzeelutionsschritte im SELEX-Prozess (siehe Abb. 4.6). Nach thermischer Equilibrierung der ssDNA (siehe Kap. 4.5.4) und dreimaligem Waschen der Beads mit je 500 μL Bindungspuffer fand die Bindung der Aptamere an die Target-Beads statt (30 min, 21 $^{\circ}\text{C}$, Thermomixer, 1000 rpm). Für die Bindung von Ethanolamin wurden $1\text{--}3 \times 10^7$ Ethanolamin-Beads und ~ 20 pmol der ssDNA des jeweiligen Aptamerklons in 500 μL Bindungspuffer eingesetzt. Im Falle der löslichen Sporenfraktion kamen 1×10^8 Target-Beads und 50 pmol Aptamer-DNA in 500 μL Bindungspuffer zum Einsatz. Die überschüssige, nicht bindende DNA wurde mit Puffer (5x 500 μL Bindungspuffer) abgewaschen und es erfolgte eine Hitzeelution der gebundenen ssDNA-Fragmente für zweimal 7 min bei 80 $^{\circ}\text{C}$ im Thermomixer (1200 rpm) in je 100 μL Bindungspuffer. Nach Waschung und Hitzeelution wurden je eine verdünnte Probe der DNA-Bindungslösung, der Nichtbinder-Fraktion und des Eluates (unverdünnt) im Fluorometer vermessen (siehe Kap. 4.3.1).



Abb. 4.6: Schema der Bindungsversuche mit immobilisiertem Target

Erstellen von Sättigungskurven zur K_D -Wert-Bestimmung

Zur Charakterisierung der Bindungsaffinität verschiedener Aptamerklone für Ethanolamin, immobilisiert auf Magnetic Beads, wurden Sättigungskurven der Bindung aufgenommen. Die Sättigungskurven wurden zur Ermittlung der spezifischen Bindungskonstanten (Dissoziationskonstante K_D) der einzelnen Aptamere verwendet. Für die Aufnahme der Kurven wurden jeweils 1×10^7 Target-Beads mit unterschiedlichen Mengen an Aptamer-DNA (im Bereich von 2...90 nM) zur Bindung gebracht. Die Vorgehensweise entsprach den beschriebenen Bindungsversuchen (siehe oben, Abb. 4.6).

Die Dissoziationskonstanten (K_D) und die Menge an maximalen Bindungsstellen (B_{\max}) lassen sich angelehnt an die klassische Reaktionskinetik ermitteln. Die hyperbolische Beziehung zwischen der eingesetzten Menge an ssDNA [nM] (X-Achse) und der eluierten Menge an ssDNA [pmol] (Y-Achse), kann durch eine nichtlineare Regressionsanalyse mit folgender hyperbolischer Funktion beschrieben werden:

$$y = \frac{P_1 x}{P_2 + x}$$

Dabei liefert P_1 den Wert für B_{\max} [pmol] und P_2 den K_D -Wert [nM].

Um eine lineare Regressionsanalyse durchführen zu können, mussten die Bindungsdaten linearisiert werden. Dies geschah mit Hilfe eines Scatchard-Plots. Hierbei wurde die gebundene Menge an ssDNA [pmol] auf der x-Achse und die gebundene Menge an ssDNA geteilt durch die eingesetzte Menge an ssDNA [angegeben als Konzentration in nM] auf der y-Achse aufgetragen.

Durch lineare Regressionsanalyse wird folgende Geradengleichung erhalten: $y = mx + b$

Dabei gilt: $m = -\frac{1}{K_D}$ und $-\frac{b}{m} = B_{\max}$

Hieraus lassen sich nun ebenfalls die Dissoziationskonstante (K_D) und B_{\max} errechnen. Die Ergebnisse beider Berechnungsmethoden wurden vergleichend gegenüber gestellt.

4.8.2 Affinitäts-Elutionen

Die Affinitäts-Elutions-Versuche dienten dazu, nachzuweisen, ob die einzelnen Aptamere auch in der Lage sind, an freies, nicht immobilisiertes Target zu binden. Ebenso wurde die Kreuzspezifität der individuellen Klone zu strukturell oder funktionell ähnlichen Substanzen getestet, um einen Hinweis auf die Strukturelemente im Target zu erhalten, an die die Aptamere binden. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 4.7 schematisch dargestellt.

Die monoklonale Aptamer-DNA (10 pmol in 500 μ L Bindungspuffer) wurde auch hier zunächst thermisch equilibriert und zur Bindung mit auf Beads immobilisiertem Target (1×10^7) gebracht (siehe Kap. 4.8.1). Nachdem die ungebundene DNA abgetrennt worden war, wurde eine Affinitäts-Elution mit dem Target oder der ausgesuchten Substanz im Überschuss durchgeführt. Dazu wurden die Aptamer-Target-Komplexe in 500 μ L Bindungspuffer mit 5 μ mol der entsprechenden Substanz gegeben und 15 min bei 21 °C im Thermomixer (1200 rpm) eluiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit je 200 μ L Bindungspuffer gewaschen und die drei Waschfraktionen in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Schließlich folgte eine Hitzebehandlung, um die noch verbliebenen Aptamere von den Beads zu entfernen (Hitzeelution, wie in Kap. 4.8.1 beschrieben).

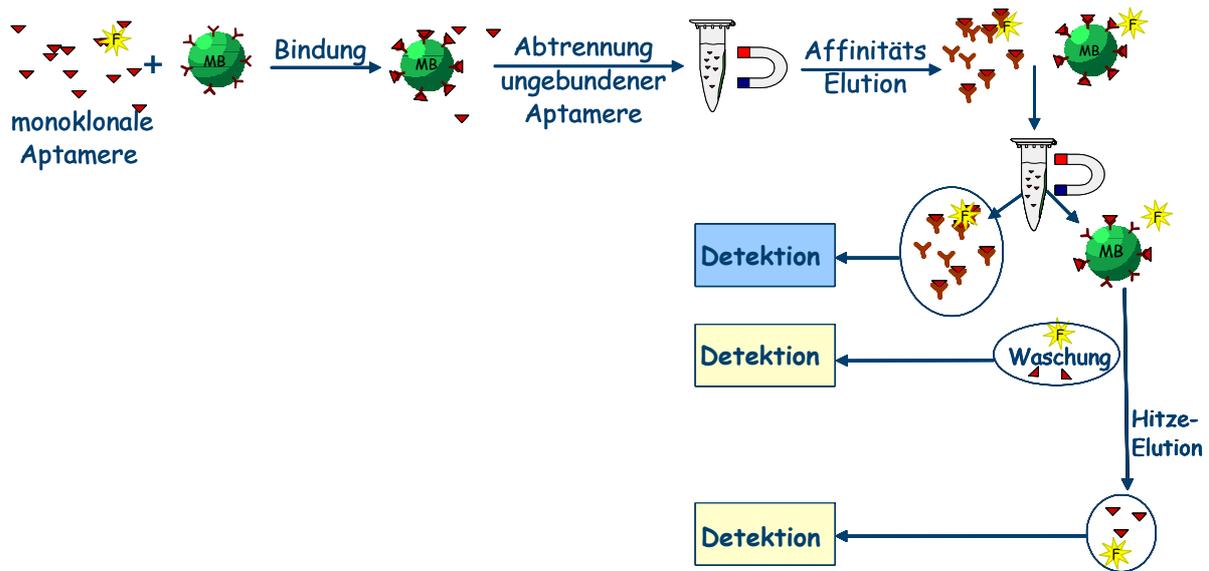


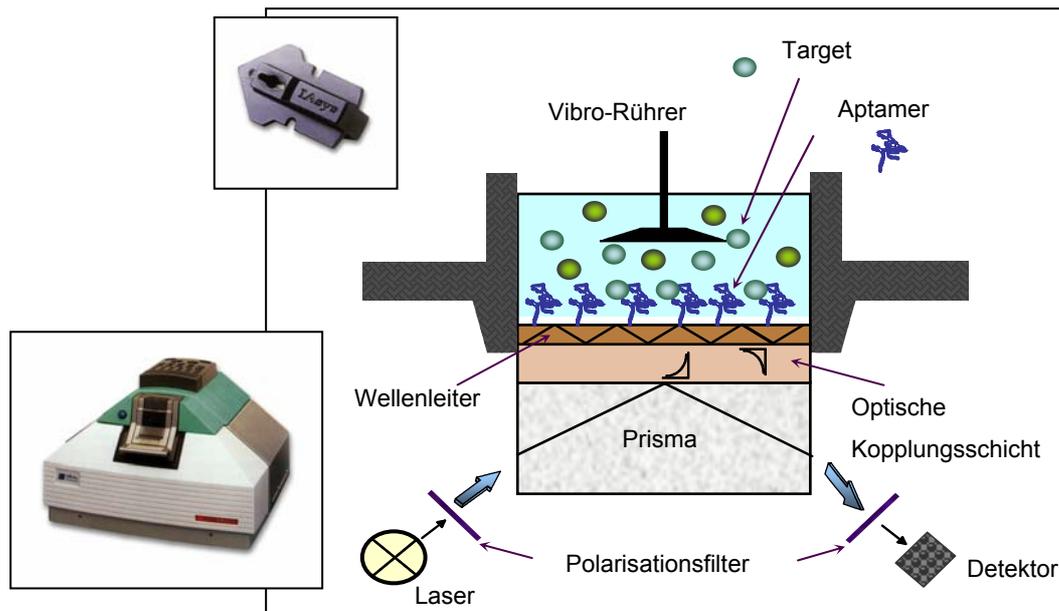
Abb. 4.7: Schema der Bindungsversuche mittels Affinitäts-Elution

Alle erhaltenen Fraktionen wurden fluorometrisch vermessen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass mit dieser Methode alle gebundene ssDNA auch wieder gefunden wird. Daher wurde der Anteil der affinitätseluierten ssDNA prozentual zur gebundenen ssDNA ausgewertet und dargestellt.

4.8.3 Versuche mit dem IAsys-Affinitätssensor

Der IAsys-Affinitätssensor wird kommerziell von der Firma NeoSensors Ltd. (Farfield Group Ltd., UK) vertrieben und dient der markierungsfreien Untersuchung biomolekularer Interaktionen. Das Biosensorgerät ist als ein offen zugängliches, gerührtes Mikroküvetten-system aufgebaut. Die Messung der biomolekularen Wechselwirkungen beruht auf dem Prinzip der Resonant-Mirror-Spektroskopie (Buckle et al., 1993, Cush et al., 1993). Einer der beiden Bindungspartner (Rezeptor) wird dabei auf der Sensoroberfläche (Boden der Mikroküvette) immobilisiert, während der andere in Lösung vorliegt. Kommt es zur Bindung zwischen Ligand und Rezeptor, ändert sich masseabhängig der Brechungsindex in der Sensorschicht und kann detektiert werden. Je größer dabei die gebundene Masse ist, desto größer ist auch die Änderung des Resonanzwinkels. Gemessen wird in Winkelsekunden (arc sec). Für Proteine und Nukleinsäuren gilt dabei: Eine Änderung von 600 arc sec entspricht einer Bindung von 16 ng (Küvetten-Oberfläche 16 mm², bei planaren Oberflächen entspricht eine Signaländerung von 600 arc sec = 1 ng Protein bzw. Nukleinsäure pro mm², Kirsten, 2001). Die Küvetten werden mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen angeboten (CMD-, Amino-, Carboxylat-, Biotin- oder hydrophobe Oberflächen). In dieser Arbeit wurde mit biotinylierten Oberflächen gearbeitet, wobei die Immobilisierung der Aptamere über Streptavidin / Biotin erfolgte.

Abbildung 4.8 zeigt die Funktionsweise des Sensors anhand eines schematischen Küvetten-querschnitts.



(Kiesau, P. (1999) *BIOspektrum* 6, 1999, 505-06)

Abb. 4.8: IAsys-Biosensor und Probenküvette, Querschnitt durch eine Küvette mit optischen Komponenten

Immobilisierung der DNA auf der Sensoroberfläche

Für die Immobilisierung wurden die Aptamere in einer PCR am 5'-Ende biotinyliert. Die ssDNA wurde aufgereinigt, wie im SELEX-Prozess beschrieben (siehe Kap. 4.5.4). Diese biotinylierte Aptamer-DNA wurde auf planare Biotin-Küvetten immobilisiert, deren Oberflächen zunächst durch die Anbindung von Streptavidin funktionalisiert werden musste:

- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μL Bindungspuffer (mind. 5x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min
- Zugabe von 51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptavidin (PROMEGA) in 200 μL Bindungspuffer, Bindungszeit 10 min
- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μL Bindungspuffer (mind. 5x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min
- Zugabe von 0,25–0,35 μM Aptamer-DNA in 200 μL Bindungspuffer, Bindungszeit 10 min
- Immobilisierung
- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μL Bindungspuffer (mind. 5x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min

Nachbehandlung der Oberfläche durch Regeneration mit Regenerationspuffer (siehe nachfolgend)

Bindung und Dissoziation

Nach der Immobilisierung mit biotinyliertem Aptamer auf die Sensoroberfläche erfolgten die Bindungsversuche mit der löslichen Sporenfraktion und entsprechenden Negativkontrollen. Der Proteingehalt der löslichen Sporenfraktion war vorher mittels BRADFORD-Assay (siehe Kap. 4.4.1) bestimmt worden.

- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μ L Bindungspuffer (mind. 5x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min
- Zugabe von löslicher Sporenfraktion in verschiedenen Konzentrationen (3,25–97,5 μ g/mL) oder entsprechende Negativkontrollen (z.B. 0,3 μ M BSA) in 200 μ L Bindungspuffer, Bindungszeit 10 min
 - Bindung
- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μ L Bindungspuffer (mind. 5x), Dissoziationszeit 5 min
 - Dissoziation
- Erfassen der Basislinie für 3 min

Regeneration der Sensoroberfläche

Nach der Bindungsreaktion schloss sich die Regeneration (Lösen der Verknüpfung zwischen Aptamer und Target) für die Möglichkeit einer erneuten Bindung an.

- Behandlung der Oberfläche für 1 min mit 100 μ L Regenerationspuffer (1 M NaCl / 50 mM NaOH + 0,02% Tween
 - Regeneration
- mehrmaliges Waschen der Küvette mit je 190 μ L Bindungspuffer (mind. 5x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min

Im Ergebnis einer durchgeführten vollständigen Regeneration erhält man wieder eine planare Biotin-Oberfläche, die für eine erneute Anbindung von Streptavidin und Immobilisierung eines biotinylierten Moleküls zur Verfügung steht.

- Behandlung der Oberfläche für 1 min mit 100 μ L 10 M KOH
 - vollständige Regeneration
- ausgiebiges Waschen der Küvette mit je 190 μ L Bindungspuffer (~30x)
- Erfassen der Basislinie für 3 min

Die Lagerung bereits benutzter Küvetten erfolgte bei 4 °C, wobei die Sensoroberfläche mit mind. 100 μ L Bindungspuffer überschichtet wurden. Die Probekammern der Küvetten wurden mit Tesafilm verschlossen, um ein Austrocknen der Sensoroberfläche zu verhindern.

4.8.4 Affinitätsreinigung mit Aptameren

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung zwischen Aptamer und Target nachzuweisen, besteht darin, mittels immobilisierter Aptamere, das Aptamertarget aus einem Gemisch zu separieren. Dazu wurden in dieser Arbeit, biotinylierte Aptamere (bezogen von INVITROGEN GmbH, chemische Synthese, PAGE gereinigt) auf Magnetic Beads immobilisiert. Die Magnetic Beads hatten Streptavidin-funktionalisierte Oberflächen (Dynabeads M-280 Streptavidin, DYNAL). Es wurden je 2 nmol des entsprechenden Oligonukleotides, gemäß Herstellerprotokoll (User Manual Dynal), auf je 10^9 Streptavidin-Beads gebunden:

- 10^9 Streptavidin-Beads in silikonisiertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Beads 3x waschen in je 750 μ L B/W-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl)
- Beads in 300 μ L B/W-Puffer aufnehmen, Zugabe von 300 μ L Aptamer-Lösung (~2 nmol Aptamer in 300 μ L Wasser)
- Inkubation 30 min bei RT, Rotator (IntelliMixer, NeoLab, Progr.6 + vortex 25 rpm)
- Überstand verwerfen
- Beads 3x waschen in je 750 μ L B/W-Puffer
- Beads 3x waschen in je 1 mL Bindungspuffer
- Beads in 500 μ L Bindungspuffer suspendieren, Beadzahl bestimmen (siehe Kap. 4.5.3.2) und Lagerung bei 4 °C

Die Aptamer-modifizierten Beads wurden gründlich mit Bindungspuffer (5x mit je 500 μ L) gewaschen und anschließend für 30 min bei 21 °C mit 500 μ L der löslichen Sporenfraktion (Präparation siehe Kap. 4.2.3) von *Penicillium expansum* im Thermomixer (1000 rpm) zur Bindung gebracht. Die Protein-Bindungslösung hatte dabei einen Gehalt von ~0,5 mg Protein pro 500 μ L Bindungspuffer. Nach der Bindung wurde die Nichtbinderfraktion abgenommen. Die Beads wurden 5x mit je 750 μ L Bindungspuffer gewaschen. Die letzte Waschfraktion wurde aufgehoben. Es folgte eine zweimalige Hitzeelution für je 7 min bei 80 °C im Thermomixer (1200 rpm). Beide Eluatfraktionen wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt (Eluat).

Die Eluate, die Protein-Bindungslösung, die Nichtbinder- und letzte Waschfraktion wurden mit TCA gefällt (siehe Kap. 4.4.2), in 100 μ L Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Auswertung einer SDS-PAGE (siehe Kap. 4.4.3) unterzogen.

5 Ergebnisse

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

Einem Ziel der Arbeit gemäß sollten spezifische Aptamere für den Nachweis von Schimmelpilzkontaminationen in Innenraumluft selektiert werden. Dazu wurden eine Reihe von SELEX-Experimenten durchgeführt. Als Targets kamen einerseits verschieden vorbehandelte Konidien von *Penicillium expansum* und *Aspergillus versicolor* zum Einsatz; andererseits fand, nach Aufschluss der Sporen, die lösliche Fraktion von *Penicillium expansum* Sporen Anwendung im SELEX-Prozess. Das Besondere am Einsatz dieser Targets war ihre Komplexität. Ein anderer Weg, Aptamere für Schimmelpilzsporen zu gewinnen, bestand daher darin, β -1,3-Glucan als einzelnen, definierten Sporenbestandteil im SELEX-Prozess als Target zu nutzen (siehe auch Kap. 3.3.1.3).

5.1.1 *in vitro* Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Schimmelpilze

Ausgangspunkt der verschiedenen *in vitro* Selektionen waren zwei randomisierte ssDNA-Oligonukleotidbibliotheken, die in ihren strukturellen Eigenschaften eng an die Arbeiten von Crameri und Stemmer (*Crameri & Stemmer, 1993*) angelehnt waren. Ausgangsbibliothek BANK-A hatte eine Gesamtgröße von 96 Nukleotiden mit einem variablen Bereich von 60 Nukleotiden, während Ausgangsbibliothek BANK-B eine Größe von nur 76 Nukleotiden und einen variablen Bereich von 40 Nukleotiden aufwies. Beide Bibliotheken besaßen die gleichen definierten Primerregionen jeweils am 5'- und am 3'-Ende der Moleküle (siehe Kap. 4.5.2).

5.1.1.1 Vorbehandelte Sporen als Target

Bereits frühere Arbeiten hatten die Anreicherung spezifischer Aptamere für Schimmelpilzsporen zum Thema (*Kirsten, 2001; Stoltenburg & Strehlitz, 2003*). Während dieser Projektbearbeitungen zeigte sich jedoch, dass unvorbehandelte Konidien kein geeignetes Target für eine Aptamerselektion darstellen. Die Gründe dafür wurden in der undefinierten und variablen Oberflächenstruktur gesehen und in ihrer besonderen Beschaffenheit, die sie für ihre Funktion als Überdauerungsorgane besitzen (*Stoltenburg & Strehlitz, 2003*). In dieser Arbeit sollte daher versucht werden, die stark hydrophobe Oberfläche der Sporen durch verschiedene Vorbehandlungen aufzubrechen, um an die darunter liegenden Strukturen zu gelangen und diese für eine Aptamer-Bindung zugänglich zu machen.

SELEX mit thermisch vorbehandelten Sporen

In SELEX SS2 kamen thermisch vorbehandelte Sporen des Schimmelpilzes *Aspergillus versicolor* als Target zum Einsatz. Für diese Vorbehandlung wurde in das allgemeine SELEX-Protokoll (siehe Kap. 4.5.4) in jeder Runde zwischen dem zweiten und dritten Waschschrift eine zusätzliche Inkubation der Sporen bei 80 °C für 15 min eingeführt (siehe Kap. 4.2.2). Anschließend wurden die jeweils eingesetzten $\sim 10^8$ Sporen noch weitere sechsmal in Bindungspuffer (siehe Kap. 4.1) gewaschen, um alle nicht fest an der Spore verankerte Bestandteile zu entfernen. In der ersten SELEX-Runde wurden 2 nmol der Oligo-

nukleotidbibliothek BANK-A (96 nt, siehe Kap. 4.5.2) eingesetzt. Der SELEX-Prozess erfolgte gemäß den Erläuterungen in Kapitel 4.5.4 Nach der Bindung der Oligonukleotide an den thermisch vorbehandelten *Aspergillus versicolor* Sporen und entsprechender Entfernung der nichtgebundenen Moleküle, wurde eine Hitzeelution zur Rückgewinnung der sporenbindenden Oligonukleotide durchgeführt. Ab der zweiten Runde kam die gesamte, selektierte und aufgearbeitete ssDNA der Vorrunde als Ausgangspool für die nächste Runde zum Einsatz (195 pmol – 421 pmol). Es wurden 12 Selektionsrunden durchgeführt. In Tabelle 5.1 und Abbildung 5.1 sind die Mengen der jeweils eluierten ssDNA dargestellt. Zu beachten ist hierbei, dass die Werte der Runde 1 nicht direkt mit denen ab Runde 2 vergleichbar sind, da in der ersten Runde eine andere, indirekte Methode zur Konzentrationsbestimmung der ssDNA in den SELEX-Fractionen genutzt wurde (Konzentrationsbestimmung mittels OliGreen™, siehe Kap. 4.3.1). Erst ab Runde 2 wurde mit Fluorescein-markierter ssDNA gearbeitet, die eine Quantifizierung über die direkte Fluoreszenzmessung ermöglichte. Diese Besonderheit gilt es bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SELEX-Prozeduren zu berücksichtigen.

Die Ergebnisdaten des SELEX-Prozesses SS2 zeigten, dass keine Anreicherung sporenbindender Oligonukleotide erzielt werden konnte. Die Menge an eluierter ssDNA lag zwischen 0,11 pmol und 0,43 pmol bzw. zwischen $1,3 \times 10^3$ und $3,5 \times 10^3$ ssDNA-Molekülen pro Spore. Ein ansteigender Trend konnte nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde der SELEX-Prozess nach der 12. Runde abgebrochen.

Tab. 5.1: **Ergebnisse SELEX SS2**

Ergebnisse des SELEX-Prozesses SS2, durchgeführt mit thermisch vorbehandelten Sporen von *Aspergillus versicolor* als Target. Die eingesetzte Sporen-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Spore (Molekulargewicht für ein Oligonukleotid mit 96 Nukleotiden = 31392 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1 mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante]).

	SELEX SS2 (<i>A.versicolor</i> Sporen, thermisch vorbehandelt)					
	Sporen-Zahl [10 ⁸]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte ssDNA- Moleküle pro Spore
		[µg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 1 (R1)	1,08	64,3	2048	45,6	1,45	$8,1 \times 10^3$
Runde 2 (R2)	0,61	10,9	347	8,1	0,26	$2,5 \times 10^3$
Runde 3 (R3)	0,63	10,2	325	7,6	0,24	$2,3 \times 10^3$
Runde 4 (R4)	0,63	10,0	319	5,2	0,17	$1,6 \times 10^3$
Runde 5 (R5)	0,56	10,0	319	4,2	0,13	$1,4 \times 10^3$
Runde 6 (R6)	0,63	6,2	198	7,2	0,23	$2,2 \times 10^3$
Runde 7 (R7)	0,59	8,3	264	5,0	0,16	$1,6 \times 10^3$
Runde 8 (R8)	0,77	9,2	293	6,0	0,19	$1,5 \times 10^3$
Runde 9 (R9)	0,53	8,1	258	3,6	0,11	$1,3 \times 10^3$
Runde 10 (R10)	0,59	11,2	357	6,8	0,22	$2,2 \times 10^3$
Runde 11 (R11)	0,81	13,4	427	13,4	0,43	$3,2 \times 10^3$
Runde 12 (R12)	0,84	11,8	376	8,9	0,28	$2,0 \times 10^3$

Ergebnisse SELEX SS2

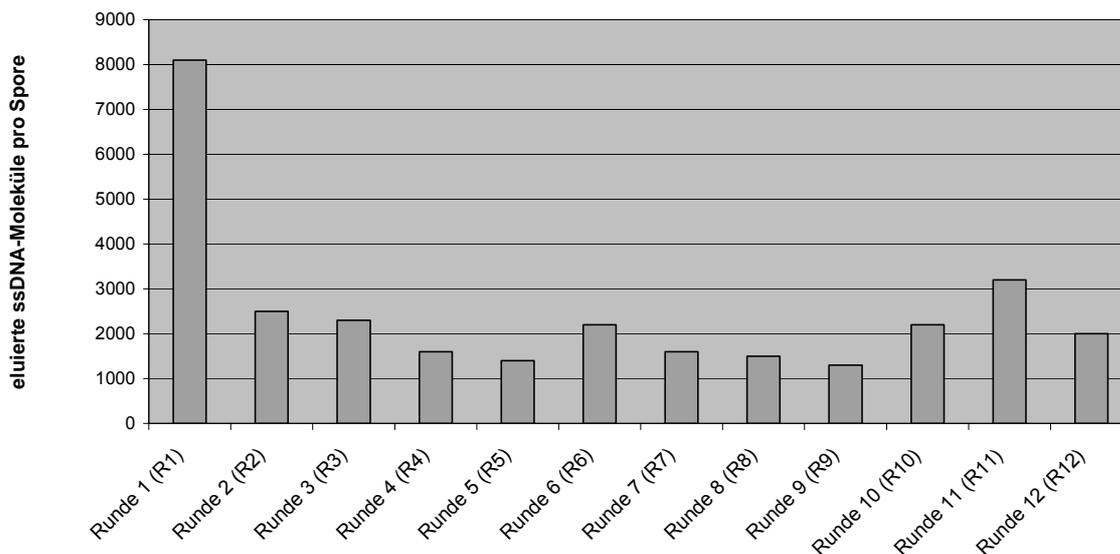


Abb. 5.1: **Ergebnisse SELEX SS2**

Ausbeute an eluierter ssDNA je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Spore. Durchgeführt wurde der SELEX-Prozess mit thermisch vorbehandelten Sporen.

Sporenquellung

Als weitere Möglichkeit vorbehandelte ganze Sporen im SELEX-Prozess als Target einzusetzen, kamen vorgequollene Konidien von *Penicillium expansum* und *Aspergillus versicolor* zur Anwendung. Die zunächst durchgeführten Vorversuche dienten dazu, auszutesten in welchem Medium und für welchen Zeitraum die Quellung der Sporen optimal für die Anwendung im SELEX-Prozess verläuft. Dazu wurden je 2×10^7 Konidien in je 1ml der folgenden Inkubationslösungen bei 37°C unter Schütteln inkubiert:

- Inkubationslösungen:
- 2 % Malzextrakt (Merck), sterilfiltriert
 - 1 % Hefeextrakt (DIFCO), sterilfiltriert
 - PBS [pH 7,35], sterilfiltriert

Nach 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h und 26 h (ÜN) wurden je 50 µL der gequollenen Sporensuspension entnommen und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Zur Kontrolle wurden 2×10^7 Zellen mit 1 mL PBS [pH 7,35] bei 4 °C aufbewahrt.

Es war kein erkennbarer Unterschied zwischen dem Quellverhalten der Sporen in 2 % Malzextrakt oder 1 % Hefeextrakt festzustellen (siehe Abb. 5.2). Nach 5 h Inkubation waren die Sporen deutlich vergrößert. In PBS fand ein verzögertes Quellen statt. Erst nach einer Inkubationszeit von 26 h konnte hier eine Sporenvergrößerung festgestellt werden. Wurden die Konidien ÜN in Nährmedien (Malz- oder Hefeextrakt) inkubiert, waren die Sporen danach vollständig ausgekeimt (siehe Abb. 3.2). Dieser Effekt war allerdings nicht erwünscht, da nur mit gequollenen, nicht aber mit ausgekeimten Sporen gearbeitet werden sollte.

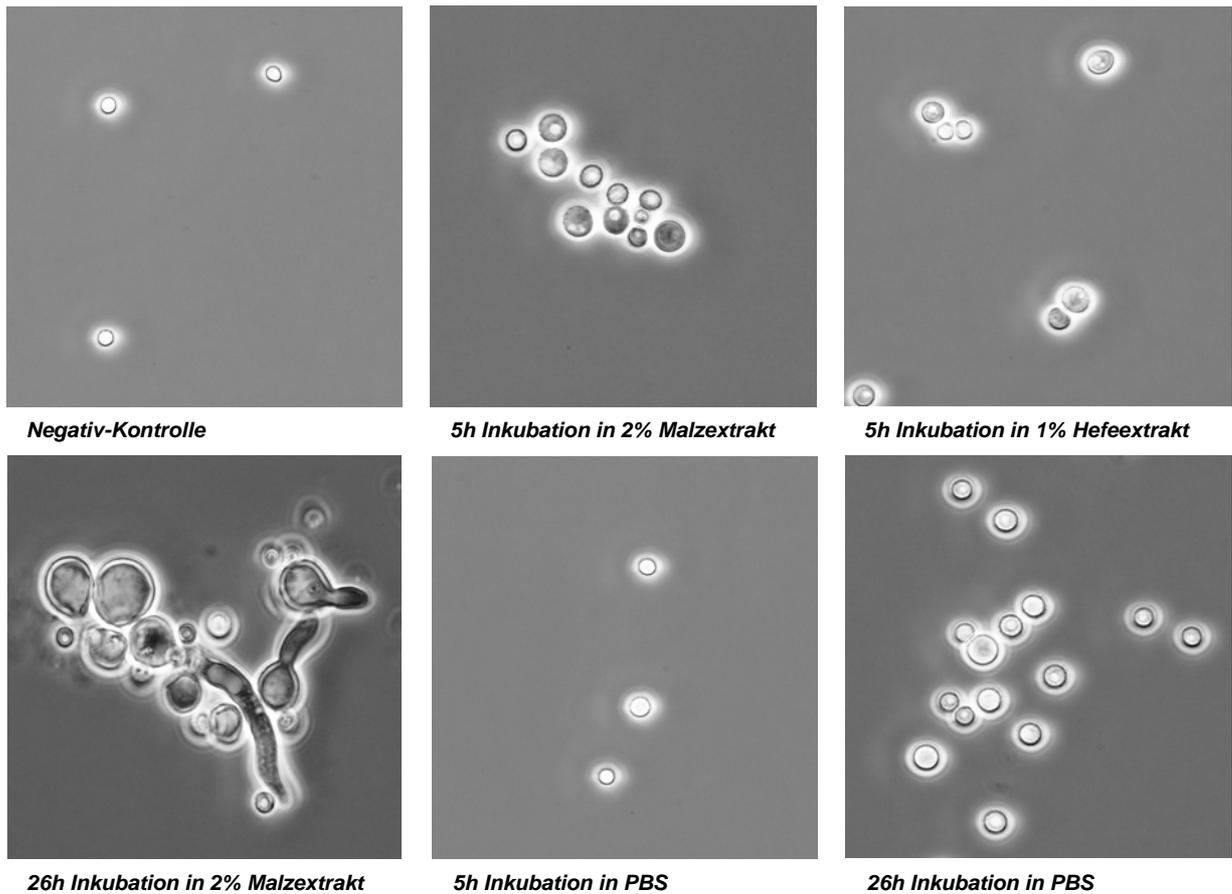


Abb. 5.2: Quellverhalten von *Penicillium expansum* Sporen

Je 2×10^7 Sporen wurden in je 1 mL PBS [pH 7,35], 2%igem Malz- und 1%igem Hefeextrakt bei 37°C für die angegebenen Zeiten unter Schütteln inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte durch Aufbewahrung der Sporen in PBS [pH 7,35] bei 4°C.

Die vorgequollenen Sporen wurden anschließend mit ~11 % Glycerin versetzt und vergleichend bei -20 °C und bei -70 °C für drei Tage gelagert. Die Auswertung erfolgte wiederum mikroskopisch. Dabei konnten keinerlei negative Effekte oder Unterschiede bei der Lagerung der vorgequollenen Sporen in 11 % Glycerin bei -20 °C oder bei -70 °C festgestellt werden.

In Auswertung dieser Ergebnisse wurde folgendes Protokoll für die Vorbehandlung der Sporen mittels Quellung vor der Verwendung als Target im SELEX-Prozess festgelegt:

- Die Konidien wurden für 5 h in 2 % Malzextrakt bei 37 °C im Thermomixer (800 rpm) inkubiert.
- Anschließend wurden die vorgequollenen Sporen mit ~11 % Glycerin versetzt, aliquotiert (je 10^8 Sporen) und bei -70 °C gelagert.
- Unmittelbar vor jeder SELEX-Runde wurden die Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und nach entsprechenden Waschungen im Prozess eingesetzt (siehe Kap. 4.2.2 und 4.5.4).

SELEX mit vorgequollenen Sporen

Repräsentierend für die Versuche mit vorgequollenen Sporen als Target in den *in vitro* Selektionen werden die Ergebnisse des SELEX SS9 vorgestellt. In diesem SELEX-Prozess wurde mit Konidien des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* gearbeitet, die entsprechend dem erarbeiteten Protokoll (siehe oben und Kap. 4.2.2) vorbehandelt wurden. Gemäß dem allgemeinen SELEX-Protokoll (siehe Kap. 4.5.4) wurden die vorgequollenen Sporen ($\sim 10^8$ Sporen pro SELEX-Runde) nach dem Auftauen bei Raumtemperatur achtmal in Bindungspuffer gewaschen, bevor sie zur Bindung mit ~ 2 nmol der Ausgangsbibliothek BANK-B (76 nt) gebracht wurden. Nach Entfernen der nichtgebundenen ssDNA-Moleküle durch Waschung in Bindungspuffer wurden die Sporen-bindenden Oligonukleotide mit Hitze eluiert (bei 80 °C in Bindungspuffer). Die gesamte eluierte und aufgearbeitete ssDNA diente als Ausgangspool für die nächste SELEX-Runde. Runde 2 und 3 wurden analog durchgeführt. Ab der vierten Runde wurde nach dem Bindungsschritt und dem Waschen zur Entfernung der ungebundenen Moleküle eine Affinitätselution mit Laminarin durchgeführt. Laminarin ist ein β -Glucan, welches dem in Schimmelpilzzellwänden vorkommenden stark ähnelt (siehe Kap. 3.3.1.3). Für diese Affinitätselution kamen 200 μ L einer 2 mg/mL Laminarinslösung (in Bindungspuffer) zum Einsatz. Eluiert wurde für 30 min bei 21 °C im Thermomixer. Anschließend schloss sich eine zweimalige Waschung der Sporen in Bindungspuffer und eine Hitzeelution bei 80 °C an. Für eine Verwendung als Ausgangspool für die jeweilige nächste Runde wurde ab Runde 4 die Fraktion der Laminarin-eluierten ssDNA amplifiziert und entsprechend präpariert (siehe Kap. 4.5.4). Tabelle 5.2 und Abbildung 5.3 zeigen eine Zusammenstellung der mittels Fluoreszenzmessung ermittelten Werte der einzelnen Fraktionen der verschiedenen SELEX-Runden (eingesetzte Sporen-Zahl, Menge an eingesetzter und eluierter ssDNA, Anzahl der eluierten ssDNA-Moleküle pro Spore). Runde RO wurde ohne den Einsatz von ssDNA durchgeführt. Hiermit sollte geprüft werden, ob in den einzelnen Fraktionen des durchgeführten Prozesses mittels Fluoreszenzmessung unspezifische Werte gemessen wurden, die kein Maß für die eluierte ssDNA darstellen. Dazu wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte in DNA-Äquivalente umgerechnet, um einen Vergleich zu den anderen Runden zu erhalten.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Anreicherung Sporen-spezifischer Aptamere auf diesem Wege nicht möglich war. Die relativ hohen Werte, die bei einer ssDNA-Elution mit Hitze in den einzelnen Runden gemessen wurden ($2\text{--}3$ pmol bzw. $5,4 \times 10^3$ bis $1,2 \times 10^4$ eluierte ssDNA-Moleküle pro Spore), sind auf unspezifische Artefakte zurückzuführen. Das bewiesen die Kontrollmessungen, bei denen im Versuch keine ssDNA eingesetzt wurde (Versuch RO). Trotzdem wurden auch hier nach einer Hitzeelution äquivalente Werte ermittelt (~ 3 pmol bzw. $1,1 \times 10^4$ eluierte ssDNA-Moleküle pro Spore). Über diese unspezifischen Werte hinaus konnte kein Anstieg der Messwerte und damit keine Anreicherung sporenspezifischer ssDNA beobachtet werden.

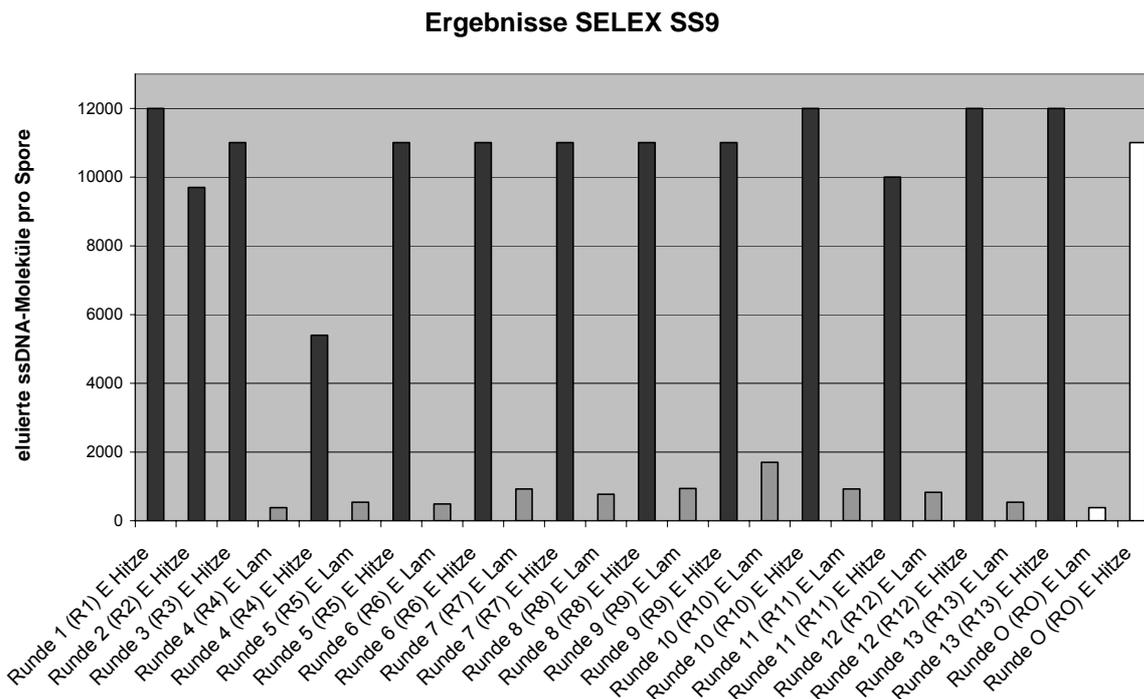
Auch die eingeführte Veränderung der Elution (Affinitätselution mit Laminarin) brachte nicht den gewünschten Erfolg. Ein anhaltend steigender Trend der Menge an affinitätselulierter ssDNA konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ausbeuten pro Runde lagen zwischen 0,09 pmol und 0,42 pmol ($3,8 \times 10^2$ bis $1,7 \times 10^3$ eluierte ssDNA-Moleküle pro Spore). Der SELEX-Prozess SS9 wurde nach der 13. Runde abgebrochen.

Tab. 5.2: **Ergebnisse SELEX SS9**

Ergebnisse des SELEX SS9, durchgeführt mit Sporen von *Penicillium expansum* als Target. Die Sporen wurden vor ihrem Einsatz 5 h in 2 % Malzextrakt vorgequollen und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C (unter Zusatz von ~11 % Glycerin) gelagert. In den Runden 1–3 wurde die Sporenbindende ssDNA mit Hitze eluiert (E Hitze), ab Runde 4 wurde zunächst eine Affinitätselution mit β -Glucan (Laminarin) vorgeschaltet (E Lam) und erst anschließend mit Hitze eluiert (E Hitze). Ab Runde 4 wurde jeweils die Laminarin-eluierte und aufgearbeitete ssDNA als Ausgangspool für jede folgende SELEX-Runde verwendet. In SELEX-Runde RO wurde keine Ausgangs-DNA eingesetzt. Für jede Runde wurden die eingesetzte Sporen-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Spore (Molekulargewicht für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1 mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante]).

	SELEX SS9					
	<i>(P.expansum Sporen, 5 h gequollen in 2 % Malzextrakt)</i>					
	Sporen-Zahl [10 ⁸]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Spore
	[μ g]	[pmol]	[ng]	[pmol]		
Runde 1 (R1) E Hitze	0,79	48,4	1948	401	16,14	$1,2 \times 10^5$
Runde 2 (R2) E Hitze	0,66	8,8	354	33,4	1,35	$9,7 \times 10^3$
Runde 3 (R3) E Hitze	0,86	9,8	394	48,2	1,94	$1,1 \times 10^4$
Runde 4 (R4) E Lam	0,81	11,5	463	1,6	0,06	$3,8 \times 10^2$
Runde 4 (R4) E Hitze	0,81	11,5	463	22,7	0,92	$5,4 \times 10^3$
Runde 5 (R5) E Lam	0,78	10,4	418	2,2	0,09	$5,4 \times 10^2$
Runde 5 (R5) E Hitze	0,78	10,4	418	42,9	1,73	$1,1 \times 10^4$
Runde 6 (R6) E Lam	0,82	9,5	382	2,1	0,08	$4,9 \times 10^2$
Runde 6 (R6) E Hitze	0,82	9,5	382	45,4	1,83	$1,1 \times 10^4$
Runde 7 (R7) E Lam	1,16	7,1	286	5,6	0,23	$9,3 \times 10^2$
Runde 7 (R7) E Hitze	1,16	7,1	286	65,0	2,62	$1,1 \times 10^4$
Runde 8 (R8) E Lam	1,17	6,5	262	4,7	0,19	$7,7 \times 10^2$
Runde 8 (R8) E Hitze	1,17	6,5	262	66,7	2,68	$1,1 \times 10^4$
Runde 9 (R9) E Lam	1,23	6,0	241	6,0	0,24	$9,4 \times 10^2$
Runde 9 (R9) E Hitze	1,23	6,0	241	67,4	2,71	$1,1 \times 10^4$
Runde 10 (R10) E Lam	1,21	6,2	249	10,5	0,42	$1,7 \times 10^3$
Runde 10 (R10) E Hitze	1,21	6,2	249	74,6	3,00	$1,2 \times 10^4$
Runde 11 (R11) E Lam	1,31	6,5	262	6,3	0,25	$9,3 \times 10^2$
Runde 11 (R11) E Hitze	1,31	6,5	262	69,9	2,80	$1,0 \times 10^4$
Runde 12 (R12) E Lam	1,20	5,4	217	5,2	0,21	$8,3 \times 10^2$
Runde 12 (R12) E Hitze	1,20	5,4	217	76,8	3,09	$1,2 \times 10^4$
Runde 13 (R13) E Lam	0,82	6,3	254	6,3	0,09	$5,4 \times 10^2$
Runde 13 (R13) E Hitze	0,82	6,3	254	50,7	2,04	$1,2 \times 10^4$
Runde O (RO) E Lam	1,22	0	0	2,4	0,10	$3,8 \times 10^2$
Runde O (RO) E Hitze	1,22	0	0	72,9	2,93	$1,1 \times 10^4$

Ein Teil der affinitätseluierten und aufgearbeiteten ssDNA der achten Runde wurde in einem weiteren Versuch (SELEX SS9-L) mit Laminarin-Beads zur Bindung gebracht. Diese Variation des SELEX SS9 ist im folgenden Kapitel (Kap. 5.1.1.2) näher beschrieben.

Abb. 5.3: **Ergebnisse SELEX SS9**

Ausbeute an eluierter ssDNA je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Spore. Durchgeführt wurde der SELEX-Prozess mit vorgequollenen Sporen. **Schwarz** dargestellt sind die Hitze-eluierten Fraktionen, **grau** die Eluatfraktionen, bei denen mit Laminarin Affinitätseluiert wurde. Runde RO (ohne Einsatz von ssDNA) wurde **weiß** abgebildet.

5.1.1.2 Immobilisiertes β -Glucan als Target

Ein anderer Ansatz zur Gewinnung von Schimmelpilz-spezifischen Aptameren war, nicht mit ganzen Konidien als komplexem Target zu arbeiten, sondern einen definierten Sporenbestandteil als Zielmolekül im SELEX einzusetzen. Nach Literaturrecherchen (siehe Kap. 3.3.1.3) wurde dafür β -1,3-Glucan als Bestandteil der Sporenzellwände ausgewählt. Kommerziell verfügbar und dem β -Glucan der Schimmelpilze sehr ähnlich ist Laminarin, ein Strukturpolysaccharid einer Braunalge. Es wurde bereits erfolgreich zum Nachweis von Schimmelpilzen mittels Antikörpern (ELISA) eingesetzt (*Douwes et al., 1996; Milton et al., 2001*) und findet wegen seiner prinzipiellen Eignung und guten Verfügbarkeit hier Verwendung als Target im SELEX-Prozess.

Für den Einsatz in einem FluMag-SELEX-Prozess (siehe Kap. 3.2.4.3), wurde Laminarin auf Magnetic Beads immobilisiert (Laminarin-Beads). Die Immobilisierung erfolgte im stark basischen Milieu (pH ~12) an Epoxy-Beads (Immobilisierungsprotokoll siehe Kap. 4.5.3.3). Freie Bindungsstellen wurden entweder mit Ethanolamin oder Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt. Durch Vergleichsmessungen der Immobilisierungslösungen vor und nach der Immobilisierung (Laminarin-Nachweis siehe Kap. 4.5.3.3) wurde festgestellt, dass unter den gewählten Bedingungen jeweils ~20 μ g Laminarin pro 10^8 Beads immobilisiert wurden.

Zunächst wurde SELEX SL1 ausgeführt. In diesem SELEX-Prozess kamen Laminarin-Beads zum Einsatz, deren freie Bindungsstellen mit Ethanolamin abgesättigt worden waren. Im Ergebnis dieses SELEX-Prozesses (genaue Beschreibung siehe Kap. 5.2.1) wurden Aptamere gegen Ethanolamin, nicht aber gegen Laminarin angereichert. Um diesen Effekt in

weiteren *in vitro* Selektionen zu vermeiden, wurde in den folgenden SELEX-Prozessen vor jede einzelne Runde eine Negativ-Selektion mit ca. 10^8 Ethanolamin-modifizierten Epoxy-Beads vorgeschaltet. Die „Nichtbinderfraktion“ aus jeder dieser Negativ-Selektionen wurde dann zur eigentlichen Bindung mit den Laminarin-Beads gebracht. Trotz der vorgeschalteten Negativ-Selektionen erfolgte wiederum eine Anreicherung für die Negativ-Beads mit Ethanolamin (SELEX SL3, Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden kam daher Rinderserumalbumin (BSA) als Blockierungssubstanz zum Einsatz. Zusätzlich zu den Negativ-Selektionen (Epoxy-Beads mit BSA) wurde die eigentliche Bindungsreaktion zwischen ssDNA und Laminarin-Beads in Gegenwart von $6 \mu\text{M}$ BSA durchgeführt. Eventuelle noch verbliebene BSA-bindende Oligonukleotide wurden somit bei den anschließenden Waschungen entfernt. Mit dieser Vorgehensweise sollte die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung unspezifischer ssDNA-Moleküle noch weiter verringert werden.

Stellvertretend für die mit Laminarin-Beads durchgeführten Versuche sollen hier SELEX SL6 und SL7 beschrieben werden. Beide SELEX-Prozesse gingen aus derselben Ausgangsrunde (R1) hervor. In dieser ersten Runde kamen $\sim 2 \text{ nmol}$ der Ausgangsbibliothek BANK-B (76 nt, siehe Kap. 4.5.2) zum Einsatz. Zunächst wurde eine Negativ-Selektion mit 2×10^8 BSA-Beads durchgeführt. Die erhaltene Nichtbinderfraktion wurde zur Bindungsreaktion mit 10^8 Laminarin-Beads gebracht. Nach dem Waschen des Bindungskomplexes wurde die Bead-gebundene ssDNA zunächst mit einer Laminarinlösung ($800 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ Bindungspuffer) affinitätseluiert. Anschließend erfolgte eine Ablösung der noch verbliebenen Bead-gebundenen Oligonukleotide mittels Hitze. Die Laminarin-eluierte, amplifizierte und aufgearbeitete ssDNA diente als Ausgangspool für die zweite Runde des SELEX SL6, während die Fraktion, die mit Hitze eluiert wurde, als Ausgangs-DNA für SELEX SL7 Verwendung fand. Beide *in vitro* Selektionen wurden nun getrennt ausgeführt. In SELEX SL6 wurde immer mit Laminarin eluiert, während in SELEX SL7 die Hitzeelution zur Anwendung kam. Darüber hinaus wurden beide SELEX-Prozesse nach dem allgemeinen SELEX-Protokoll (siehe Kap. 4.5.4), bzw. gemäß den oben genannten Erläuterungen durchgeführt.

Die Tabellen 5.3 und 5.4, sowie die Abbildungen 5.4 und 5.5 zeigen die Ergebnisse der beiden SELEX-Prozesse SL6 und SL7. In den Tabellen wurden zusätzlich zu den Werten der eigentlichen SELEX-Runden auch die ermittelten Werte für die Negativ-Selektionen aufgelistet. Diese Kontrolle erfolgte, damit bei einer eventuellen Anreicherung von nicht gewünschten ssDNA-Molekülen für die Negativ-Beads der SELEX sofort hätte modifiziert oder abgebrochen werden können. Die Ergebnisse zeigen aber, dass keine solche Anreicherung eintrat. Es konnte allerdings auch keine Anreicherung für die gewünschten Laminarin-Strukturen beobachtet werden. Weder SELEX SL6 noch SELEX SL7 zeigte einen anhaltend steigenden Trend. Die eluierten ssDNA-Mengen der zweiten bis elften Runde waren sehr gering ($0\text{--}0,28 \text{ pmol}$ bzw. $0\text{--}1,7 \times 10^3$ ssDNA-Moleküle pro Bead). Diese Werte liegen an der Nachweisgrenze der Quantifizierungsmethode über direkte Fluoreszenzmessung (Stoltenburg & Strehlitz, 2003). Damit erklärt sich auch, warum in einzelnen Runden eine Menge von 0 pmol eluierter ssDNA ermittelt wurde. Beide SELEX-Prozesse wurden nach der elften Runde abgebrochen.

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

Tab. 5.3: **Ergebnisse SELEX SL6**

Ergebnisse des SELEX SL6, durchgeführt mit Laminarin-Beads, deren freie Bindungsstellen mit BSA geblockt waren, als Target. Vor jeder Runde wurde eine Negativ-Selektion (Neg*) mit je 10^8 Negativ-Beads (BSA-Beads) vorgeschaltet. Die Bindung zwischen Laminarin-Beads und ssDNA fand in Gegenwart von $6 \mu\text{M}$ BSA statt. Eluiert wurde mit einer Laminarinlösung ($800 \mu\text{g}$ Laminarin in $500 \mu\text{L}$ Bindungspuffer). Die eingesetzte Laminarin-Bead- und Negativ-Bead-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Bead (für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1 mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

	SELEX SL6 (Laminarin-Beads; vorher "Negativ*-Selektion"), eluiert mit Laminarin					
	Bead-Zahl [10^8]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Bead
		[μg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 1 (R1)	1,16	46,3	1863	24,1	0,97	$5,0 \times 10^3$
Runde 1 (R1)Neg*	2,4	46,3	1863	22,2	0,89	$2,2 \times 10^3$
Runde 2 (R2)	1,13	9,6	386	1,7	0,07	$3,7 \times 10^2$
Runde 2 (R2)Neg*	1,06	9,6	386	0,3	0,01	$6,9 \times 10^1$
Runde 3 (R3)	1,13	8,1	326	0,0	0,00	0
Runde 3 (R3)Neg*	1,18	8,1	326	0,3	0,01	$6,2 \times 10^1$
Runde 4 (R4)	1,11	7,9	318	0,0	0,00	0
Runde 4 (R4)Neg*	1,23	7,9	318	0,8	0,03	$1,6 \times 10^2$
Runde 5 (R5)	1,11	8,3	334	0,2	0,01	$4,4 \times 10^1$
Runde 5 (R5)Neg*	1,13	8,3	334	0,6	0,02	$1,3 \times 10^2$
Runde 6 (R6)	1,14	11,9	479	0,2	0,01	$4,3 \times 10^1$
Runde 6 (R6)Neg*	1,17	11,9	479	1,3	0,05	$2,7 \times 10^2$
Runde 7 (R7)	1,14	8,4	338	1,3	0,05	$2,8 \times 10^2$
Runde 7 (R7)Neg*	1,2	8,4	338	1,5	0,06	$3,0 \times 10^2$
Runde 8 (R8)	1,14	10,4	418	2,8	0,11	$6,0 \times 10^2$
Runde 8 (R8)Neg*	1,26	10,4	418	2,0	0,08	$3,9 \times 10^2$
Runde 9 (R9)	1,14	9,6	386	0,2	0,01	$4,3 \times 10^1$
Runde 9 (R9)Neg*	1,24	9,6	386	0,0	0,00	0
Runde 10 (R10)	0,97	11,1	447	7,0	0,28	$1,7 \times 10^3$
Runde 10 (R10)Neg*	1,04	11,1	447	2,2	0,09	$5,1 \times 10^2$
Runde 11 (R11)	1,04	10	402	0,9	0,04	$2,1 \times 10^2$
Runde 11 (R11)Neg*	1,1	10	402	0,7	0,03	$1,5 \times 10^2$

Ergebnisse SELEX SL6

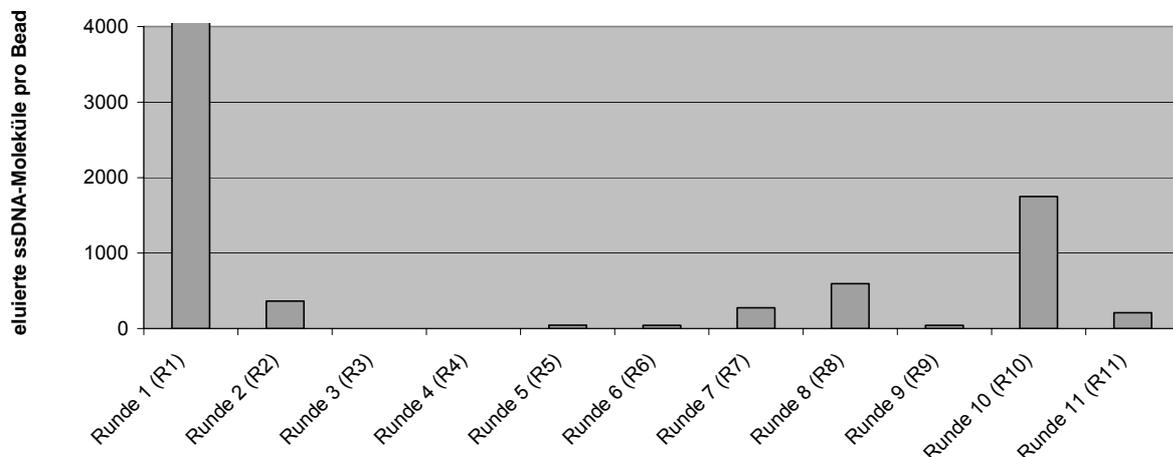


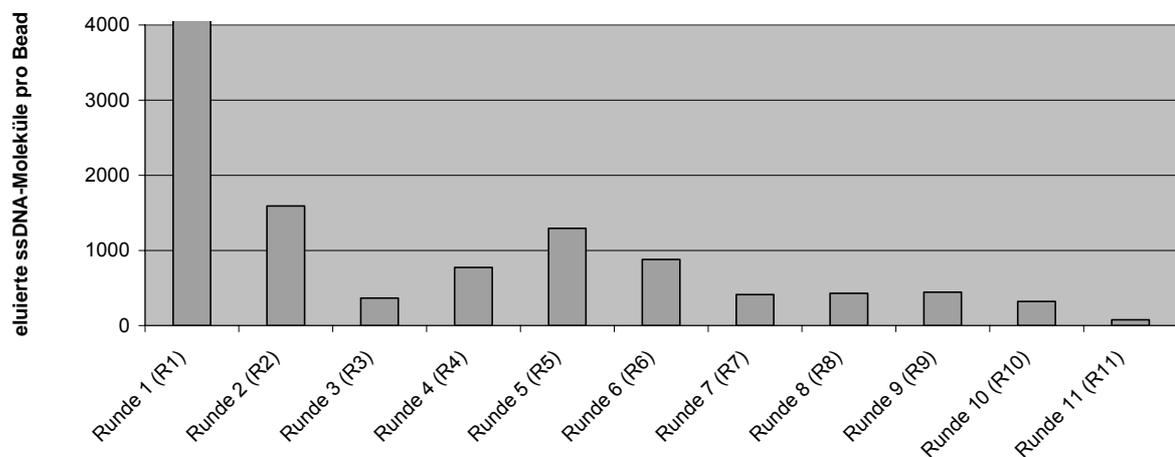
Abb. 5.4: **Ergebnisse SELEX SL6**

Ausbeute an eluierter ssDNA von den Laminarin-Beads je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Bead. Durchgeführt wurde SELEX SL6 mit Laminarin-Beads. Die Elution der Bead-gebundenen ssDNA-Moleküle erfolgte mittels Affinitätselution mit Laminarin.

Tab. 5.4: **Ergebnisse SELEX SL7**

Ergebnisse des SELEX SL7, durchgeführt mit Laminarin-Beads, deren freie Bindungsstellen mit BSA geblockt waren, als Target. Vor jeder Runde wurde eine Negativ-Selektion (Neg*, grün dargestellt) mit je 10^8 Negativ-Beads (BSA-Beads) vorgeschaltet. Die Bindung zwischen Laminarin-Beads und ssDNA fand in Gegenwart von $6 \mu\text{M}$ BSA statt. Eluiert wurde mit Hitze. Die eingesetzte Laminarin-Bead- und Negativ-Bead-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Bead (für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1 mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

	SELEX SL7 (Laminarin-Beads; vorher "Negativ*-Selektion"), eluiert mit Hitze					
	Bead-Zahl [10^8]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Bead
		[μg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 1 (R1)	1,16	46,3	1863	83,3	3,35	$1,7 \times 10^4$
Runde 1 (R1)Neg*	2,40	46,3	1863	59,3	2,39	$6,0 \times 10^3$
Runde 2 (R2)	0,96	11,6	467	6,3	0,25	$1,6 \times 10^3$
Runde 2 (R2)Neg*	1,13	11,6	467	1,6	0,06	$3,4 \times 10^2$
Runde 3 (R3)	1,13	10,2	410	1,7	0,07	$3,7 \times 10^2$
Runde 3 (R3)Neg*	1,18	10,2	410	3,5	0,14	$7,2 \times 10^2$
Runde 4 (R4)	1,16	10,8	435	3,7	0,15	$7,7 \times 10^2$
Runde 4 (R4)Neg*	1,18	10,8	435	4,6	0,19	$9,5 \times 10^2$
Runde 5 (R5)	1,18	9,6	386	6,3	0,25	$1,3 \times 10^3$
Runde 5 (R5)Neg*	1,14	9,6	386	2,4	0,10	$5,1 \times 10^2$
Runde 6 (R6)	1,08	12,6	507	3,9	0,16	$8,8 \times 10^2$
Runde 6 (R6)Neg*	1,08	12,6	507	5,2	0,21	$1,2 \times 10^3$
Runde 7 (R7)	1,12	10,2	410	1,9	0,08	$4,1 \times 10^2$
Runde 7 (R7)Neg*	1,12	10,2	410	3,9	0,16	$8,2 \times 10^2$
Runde 8 (R8)	1,19	10,8	435	2,1	0,08	$4,3 \times 10^2$
Runde 8 (R8)Neg*	1,25	10,8	435	4,6	0,19	$8,9 \times 10^2$
Runde 9 (R9)	1,2	12,8	515	2,2	0,09	$4,4 \times 10^2$
Runde 9 (R9)Neg*	1,27	12,8	515	1,2	0,05	$2,3 \times 10^2$
Runde 10 (R10)	1,06	12,6	507	1,4	0,06	$3,2 \times 10^2$
Runde 10 (R10)Neg*	1,07	12,6	507	30,7	1,24	$6,9 \times 10^3$
Runde 11 (R11)	0,95	11,5	463	0,3	0,01	$7,7 \times 10^1$
Runde 11 (R11)Neg*	1,00	11,5	463	8,1	0,33	$1,9 \times 10^3$

Ergebnisse SELEX SL7Abb. 5.5: **Ergebnisse SELEX SL7**

Ausbeute an eluierter ssDNA von den Laminarin-Beads je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Bead. Durchgeführt wurde SELEX SL7 mit Laminarin-Beads. Die Elution der Bead-gebundenen ssDNA-Moleküle erfolgte mittels Hitzeelution.

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

Ein anderer Versuch bestand darin, ssDNA die in einem SELEX mit vorgequollenen Sporen (SS9, siehe Kap. 5.1.1.1) selektiert worden war, nun mit Laminarin-Beads zur Bindung zu bringen. Damit sollte den auftretenden fehlerhaften Fluoreszenzmessungen zur Quantifizierung des SELEX SS9, bei denen oft Artefakte gemessen wurden, entgegen gewirkt werden. Die Ablösung der sporenbindenden Oligonukleotide war im SELEX SS9 mittels Laminarinelution erfolgt. Daher sollten die eluierten ssDNA-Moleküle auch an Laminarin-Beads binden. Die Hoffnung bestand darin, den in der siebten bis zehnten Runde von SS9 gefundenen Anstieg der Messwerte bei der Laminarin-eluierten Fraktion weiter ausbauen zu können.

So wurde für SELEX-Prozess SS9-L die Laminarin-eluierte und aufgearbeitete ssDNA der achten Runde des SELEX SS9 für eine Bindung mit 10^8 Laminarin-Beads zusammen gegeben. Nach der Bindung und Abwaschung der ungebundenen ssDNA wurde analog SELEX SS9 zunächst mit Laminarin eluiert (in 200 μ L einer 2 mg/mL Laminarinlösung), anschließend zweimal gewaschen und schließlich für die Ablösung der verbliebenen Oligonukleotide eine Hitzeelution durchgeführt. Für jede weitere Runde kam der Laminarin-eluierte und aufbereitete ssDNA-Pool der Vorrunde zum Einsatz. In Runde 12L wurde die eingesetzte Bead-Zahl auf 5×10^8 erhöht, um zu prüfen, ob dann entsprechend mehr ssDNA gebunden und demzufolge eluiert werden könne.

Tab. 5.5: **Ergebnisse SELEX SS9-L**

Ergebnisse des SELEX SS9-L, durchgeführt mit Laminarin-Beads als Target. Der DNA-Ausgangspool dieses SELEX stammte aus der achten Runde des SELEX SS9, welcher mit vorgequollenen *Penicillium expansum* Sporen durchgeführt wurde. Die sporenbindende ssDNA der achten Runde aus SS9 wurde mittels Affinitätselution mit β -Glucan (Laminarin) eluiert, amplifiziert und entsprechend aufgearbeitet, bevor sie in SELEX SS9-L mit Laminarin-Beads zur Bindung gebracht wurde. Auch hier wurde zunächst mit Laminarin (E Lam) und erst anschließend mit Hitze eluiert (E Hitze). Für jede folgende SELEX-Runde wurde die Laminarin-eluierte und aufgearbeitete ssDNA als Ausgangspool verwendet. Für jede Runde wurden die eingesetzte Bead-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Bead (Molekulargewicht für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante]).

	SELEX SS9-L (Laminarin-Beads)					
	Bead-Zahl [10^8]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Bead
		[μ g]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 9L (R9L) E Lam	1,07	6,0	241	1,7	0,07	$3,1 \times 10^2$
Runde 9L (R9L) E Hitze	1,07	6,0	241	14,6	0,59	$2,6 \times 10^3$
Runde 10L (R10L) E Lam	1,16	6,3	254	1,3	0,05	$2,2 \times 10^2$
Runde 10L (R10L) E Hitze	1,16	6,3	254	3,5	0,14	$5,8 \times 10^2$
Runde 11L (R11L) E Lam	1,08	5,3	213	1,3	0,05	$2,3 \times 10^2$
Runde 11L (R11) E Hitze	1,08	5,3	213	0,05	0,00	$9,0 \times 10^0$
Runde 12L (R11L) E Lam	5,45	6,1	245	1,4	0,06	$4,9 \times 10^1$
Runde 12L (R12L) E Hitze	5,45	6,1	245	0,0	0,00	0

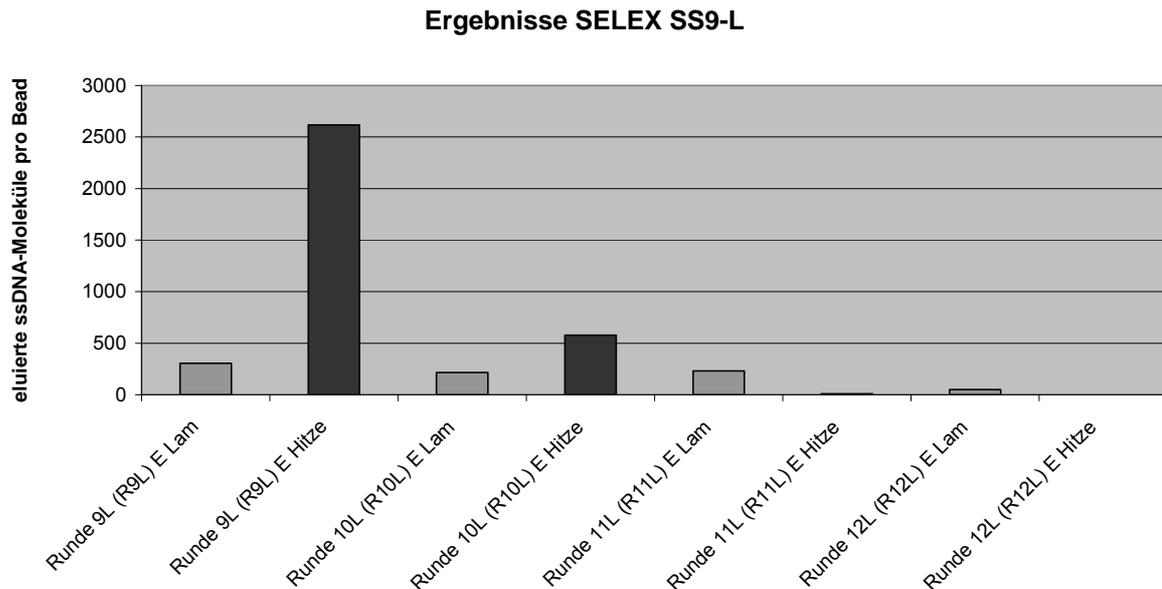


Abb. 5.6: **Ergebnisse SELEX SS9-L**

Ausbeute an eluierter ssDNA je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Bead. Durchgeführt wurde SELEX SS9-L mit Laminarin-Beads. Die Elution der Bead-gebundenen ssDNA-Moleküle erfolgte zunächst mittels Affinitätselution mit Laminarin (E Lam, grau dargestellt) und anschließend mit Hitze (E Hitze, schwarz dargestellt).

Auch mit diesem Ansatz war es nicht möglich, sporenspezifische Aptamere anzureichern. Die Laminarin-eluierten ssDNA-Mengen sind sehr gering (0,05–0,07 pmol). Auch aus der Erhöhung der eingesetzten Bead-Anzahl um das fünffache resultiert keine größere ssDNA-Menge (0,06 pmol). Ebenso konnte in den mittels Hitzeelution erhaltenen Fraktionen kein ansteigender Trend bei der eluierten ssDNA-Menge beobachtet werden. Der SELEX wurde daher nach Runde 12L abgebrochen.

5.1.1.3 Lösliche Sporenfraktion als Target

Nachdem die oben beschriebenen Strategien nicht den erwünschten Erfolg brachten, wurde nach anderen Möglichkeiten zur Gewinnung Schimmelpilz-spezifischer Aptamere gesucht. Eine Idee bestand darin, die Sporen vollständig zu zerstören und die resultierende lösliche Sporenfraktion als Target im SELEX-Prozess einzusetzen. Dafür wurden zunächst verschiedene Methoden des Sporenaufschlusses getestet. Die Versuche hierzu wurden sowohl mit vorgequollenen, als auch mit unvorbehandelten Sporen durchgeführt. Die getesteten Aufschlussmethoden waren (siehe Kap. 4.2.3):

- Schockgefrieren der Konidien in flüssigem Stickstoff und anschließendes Zermahlen in einem Mörser
- Behandlung mit Ultraschall
- Zellaufschluss mittels Kugelmühle (Schwingmühle).

Der Zustand der Konidien wurde jeweils vor und nach den entsprechenden Behandlungen mikroskopisch kontrolliert, indem die Anteile der verbliebenen nicht zerstörten Sporen bestimmt wurden.

Ein ausreichender Sporenaufschluss mit einer Aufschlusseffizienz von mehr als 95 % konnte lediglich bei Einsatz einer Kugelmühle erreicht werden (Beschreibung s. Kapitel 4.2.3) Mit den beiden anderen Aufschlussmethoden (Einsatz von flüssigem Stickstoff und Behandlung mit Ultraschall) wurden nicht mehr als 10–15 % der Sporen zerstört.

Für SELEX SP13, welcher hier beschrieben wird, kam die lösliche Sporenfraktion der unvorbehandelten Konidien von *Penicillium expansum* zum Einsatz. Nach Aufschluss der Sporen mittels Kugelmühle und Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation lag die lösliche Fraktion in PBS unter Zusatz von 1 % eines Protease-Inhibitor-Mixes vor. Die Immobilisierung der löslichen Sporenbestandteile erfolgte auf Epoxy-Beads wie in Kapitel 4.5.3.2 beschrieben. Eventuell noch freie Bindungsstellen dieser Beads (Target-Beads) wurden dabei durch das im Bindungspuffer (verwendet zum Nachwaschen) enthaltene Tris(hydroxymethyl)-aminomethan blockiert. Die entsprechenden Negativ-Beads wurden durch Inkubation von Epoxy-Beads mit PBS/1 % Protease-Inhibitor-Mix nach dem gleichen Protokoll hergestellt.

In der ersten SELEX-Runde wurden ~2 nmol der Ausgangsbibliothek BANK-B (76 nt) zunächst mit $\sim 2 \times 10^8$ Negativ-Beads inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Oligonukleotide mit $\sim 2 \times 10^8$ Target-Beads zur Bindung gebracht. Nach dem Waschen des Bindungskomplexes erfolgte eine Hitzeelution der gebundenen ssDNA-Moleküle von den Beads bei 80 °C (Beschreibung des SELEX-Protokolls siehe Kap. 4.5.4). Quantitativ ausgewertet (Bestimmung der ssDNA-Konzentration mittels Fluoreszenzmessung) wurden sowohl die vorliegenden Eluatfraktionen der Target-Beads, als auch die der Negativ-Beads. Diese Verfahrensweise wurde gewählt, um im Fall der Anreicherung von Oligonukleotiden für die Negativ-Beads sofort Modifikationen im Prozess vornehmen zu können.

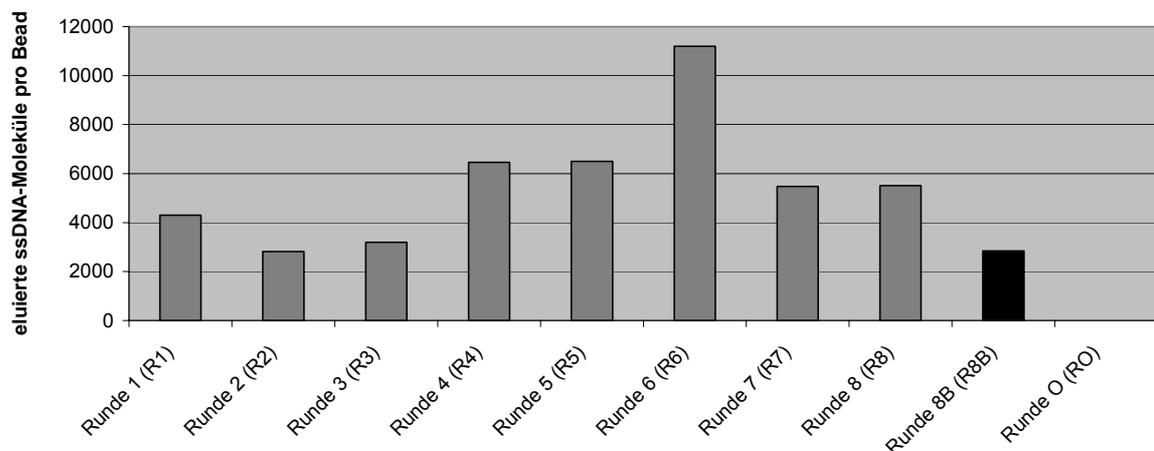
Ab Runde 2 wurden je $\sim 1 \times 10^8$ Target- und auch Negativ-Beads eingesetzt. Der ssDNA-Ausgangspool jeder folgenden Runde war immer die gesamte von den Target-Beads eluierte, amplifizierte und gereinigte ssDNA der Vorrunde (300–400 pmol). Zur Kontrolle der Spezifität des angereicherten ssDNA-Pools wurde der Ausgangspool der ssDNA in der achten SELEX-Runde geteilt und parallel mit Target-Beads von *Penicillium expansum* Sporen (Runde R8) und Target-Beads von *Penicillium brevicompactum* Sporen (Runde R8B, violett dargestellt) inkubiert. Zusätzlich wurde noch eine Runde RO (rosa dargestellt), ohne den Einsatz von ssDNA durchgeführt, um zu prüfen, ob unspezifisch abgelöste Bestandteile der Target-Beads die Fluoreszenzmessungen beeinflussten. Die in dieser Runde gemessenen Fluoreszenzwerte wurden in DNA-Äquivalente umgerechnet, um einen Vergleich zu den in Tabelle 5.6 und Abbildung 5.7 zusammengestellten Ergebnissen der einzelnen Runden des SELEX SP13 zu erhalten.

Tab. 5.6: **Ergebnisse SELEX SP13**

Ergebnisse des SELEX SP13, durchgeführt mit Target-Beads der löslichen Fraktion von *Penicillium expansum* Sporen als Target. Vor jeder Runde wurde eine Negativ-Selektion (Neg*) mit je 10^8 Negativ-Beads vorgeschaltet (Runde 1: $\sim 2 \times 10^8$ Negativ-Beads). Eluiert wurde mit Hitze. Runde R8B wurde mit Target-Beads mit Proteinen von *Penicillium brevicompactum* Sporen durchgeführt. In SELEX-Runde RO wurde keine ssDNA eingesetzt. Die eingesetzte Target-Bead- und Negativ-Bead-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Bead (für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

	SELEX SP13 (Target-Beads von <i>P.expansum</i> ; vorher "Negativ*-Selektion"), eluiert mit Hitze					
	Bead-Zahl [10^8]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Bead
		[μg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 1 (R1)	2,20	55,8	2245	39,1	1,57	$4,3 \times 10^3$
Runde 1 (R1)Neg*	1,72	55,8	2245	167	6,71	$2,3 \times 10^4$
Runde 2 (R2)	1,10	7,7	310	12,8	0,52	$2,8 \times 10^3$
Runde 2 (R2)Neg*	0,88	7,7	310	3,0	0,12	$8,3 \times 10^2$
Runde 3 (R3)	1,08	8,9	358	14,3	0,58	$3,2 \times 10^3$
Runde 3 (R3)Neg*	0,86	8,9	358	14,4	0,58	$4,1 \times 10^3$
Runde 4 (R4)	1,06	9,9	398	28,2	1,13	$6,5 \times 10^3$
Runde 4 (R4)Neg*	0,85	9,9	398	12,0	0,48	$3,4 \times 10^3$
Runde 5 (R5)	1,08	8,9	358	28,9	1,16	$6,5 \times 10^3$
Runde 5 (R5)Neg*	0,86	8,9	358	8,4	0,34	$2,4 \times 10^3$
Runde 6 (R6)	0,98	10,3	414	45,4	1,83	$1,1 \times 10^4$
Runde 6 (R6)Neg*	0,84	10,3	414	47,6	1,92	$1,4 \times 10^4$
Runde 7 (R7)	1,04	8,8	354	23,5	0,95	$5,5 \times 10^3$
Runde 7 (R7)Neg*	0,84	8,8	354	9,6	0,39	$2,8 \times 10^3$
Runde 8 (R8)	1,14	10,2	410	25,8	1,04	$5,5 \times 10^3$
Runde 8 (R8)Neg*	0,8	10,2	410	7,2	0,29	$2,2 \times 10^3$
Runde 8B (R8B)	0,99	10,2	410	11,6	0,47	$2,9 \times 10^3$
Runde 8B (R8B)Neg*	0,79	10,2	410	12,4	0,50	$3,8 \times 10^3$
Runde O (RO)	1,14	0,0	0	0,0	0,00	0
Runde O (RO)Neg	0,80	0,0	0	0,0	0,00	0

Ergebnisse SELEX SP13

Abb. 5.7: **Ergebnisse SELEX SP13**

Ausbeute an eluierter ssDNA je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Bead. Durchgeführt wurde SELEX SP13 mit Target-Beads von *Penicillium expansum* Sporen. Die Elution der Bead-gebundenen ssDNA-Moleküle erfolgte mittels Hitzeelution. **Schwarz** dargestellt ist Runde R8B, in der Target-Beads mit Proteinen von *Penicillium brevicompactum* Sporen zum Einsatz kamen. Runde RO wurde ohne Einsatz von ssDNA durchgeführt.

Auffällig ist, dass in diesem SELEX-Prozess die Mengen an eluierter ssDNA in jeder Runde relativ hoch waren (0,52–1,83 pmol bzw. 2800–11000 ssDNA-Moleküle pro Bead). Auch von den Negativ-Beads wurden jeweils recht große Mengen eluiert (0,12–1,92 pmol bzw. 830–14000 ssDNA-Moleküle pro Bead). Die eluierten Mengen an DNA lagen im Unterschied zu einigen vorherigen Ergebnissen immer deutlich über Null. In der vierten Runde ist ein Anstieg der von den Target-Beads eluierten ssDNA zu erkennen (auf 1,13 pmol bzw. 6500 ssDNA-Moleküle pro Bead). Während in der fünften Runde ein vergleichbares Ergebnis erzielt wurde, erfolgte in der sechsten Runde ein weiterer Anstieg der Menge an eluierten Oligonukleotiden (1,83 pmol bzw. $1,1 \times 10^4$ ssDNA-Moleküle pro Bead). Allerdings wurde auch hier eine relativ große Menge von ssDNA in der Elutionsfraktion der Negativ-Beads gefunden (1,92 pmol bzw. $1,4 \times 10^4$ ssDNA-Moleküle pro Bead). Nach Runde 5 wurde zudem festgestellt, dass die korrekte Einzelstrangtrennung der PCR-Produkte nicht vollständig erfolgt war. Im Polyacrylamidgel der durchgeführten PAGE war keine saubere Trennung der Banden des gewünschten (+)Stranges vom (-)Strang zu sehen. Dieser Effekt wurde bereits in Runde 4 beobachtet, wenn auch nicht so stark. Aufgrund der gemessenen Ergebnisse der sechsten Runde wurde zu einer anderen Einzelstrangreinigungsmethode gewechselt. Ab Runde 6 wurden die beiden Stränge nun mittels des Ribo-Verfahrens (Nutzung des Primers AP20Ribo in der PCR, anschließend Alkalische Hydrolyse; siehe Kap. 4.3.4, Reinigung der relevanten ssDNA) voneinander getrennt.

In der darauf folgenden siebten Runde wurde eine geringere Menge an eluierter ssDNA gefunden (0,95 pmol bzw. $5,5 \times 10^3$ ssDNA-Moleküle pro Bead von den Target-Beads; 0,39 pmol von den Negativ-Beads). In der achten Runde änderten sich diese Werte nicht mehr nennenswert. So wurden von den Target-Beads 1,04 pmol bzw. $5,5 \times 10^3$ ssDNA-Moleküle pro Bead und von den Negativ-Beads 0,29 pmol bzw. $2,9 \times 10^3$ ssDNA-Moleküle pro Bead eluiert. Zur Kontrolle wurden zwei zusätzliche Runden durchgeführt. In der Runde R8B kamen Target-Beads von *Penicillium brevicompactum* Sporen zum Einsatz. Hier konnte im Vergleich zur Runde R8 nur etwa die Hälfte an eluierter ssDNA gefunden werden, was auf eine geringe Kreuzreaktivität der selektierten Oligonukleotide mit Proteinen von *Penicillium brevicompactum* hinweist. In der Runde RO wurden Target-Beads von *Penicillium expansum* eingesetzt, jedoch ohne ssDNA. Da in dieser Runde keine über den Blank-Wert erhöhten Fluoreszenzwerte gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass im Gegensatz zu SELEX SS9 hier keine unspezifische Fluoreszenz auftrat.

Die Ergebnisse des SELEX-Prozesses SP13 zeigen, dass in diesem Fall eine spezifische Anreicherung von Oligonukleotiden für die Target-Beads von *Penicillium expansum* Sporen erfolgt war. Aus diesem Grund wurde die angereicherte ssDNA der achten Runde (R8) für eine weitere Charakterisierung kloniert und anschließend sequenziert.

5.1.2 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Um die im selektierten ssDNA-Pool enthaltenen verschiedenen Oligonukleotide (Aptamere) identifizieren und charakterisieren zu können, wurde die ssDNA der achten Runde des SELEX SP13 mittels Klonierung vereinzelt. Ungefähr die Hälfte (~0,5 pmol) der von den Target-Beads eluierten ssDNA der achten Runde wurde mittels PCR unter Verwendung der unmodifizierten Primer AP10 und AP20 (siehe Kap. 4.5.2) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO (INVITROGEN) kloniert und in *E.coli* DH5 α -T1 transformiert (siehe Kap. 4.6.1). Anschließend wurden 50 der Transformanten mittels Kolonie-PCR (siehe Kap. 4.6.2) hinsichtlich des eingebauten Inserts kontrolliert. Bei 37 der Transformanten wurde ein Insert der erwarteten Größe gefunden. Die Plasmid-DNA dieser 37 Klone wurde präpariert (siehe Kap. 4.6.3; pDNA-Präparation mittels ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘, QIAGEN) und für eine Auftragssequenzierung des Aptamer-Inserts der Firma Agowa GmbH, Berlin übergeben (siehe Kap. 4.7.1). Die Aptamer-DNA konnte durch die bekannten Primerbindungsregionen am 5'- und 3'-Ende (AP10, AP20_{komplementär}) in der ermittelten Basenabfolge der einzelnen Klone eindeutig identifiziert werden. Zur Absicherung der erhaltenen Daten wurden anschließend auch die entsprechenden Gegenstränge sequenziert.

5.1.2.1 Einteilung der Sequenzen nach Primärstruktur

Für 32 der 37 sequenzierten Aptamerklone konnte eine eindeutige Sequenz bestimmt werden (siehe Abb. 5.8). Die Mehrzahl der sequenzierten Aptamere hatte eine Größe von 74–76 Nukleotiden. Kürzere Aptamere stellten lediglich Aptamer ApPilz #78 mit 71 Nukleotiden und Aptamer ApPilz #138 mit 73 Nukleotiden dar. Somit wiesen alle sequenzierten Oligonukleotide nahezu die gleiche Länge wie die Ausgangsbibliothek BANK-B (76 nt) auf.

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

Gruppe I	#1310	ATACCAGCTTATTCAATTGGG T GGGAGGGAGGGGA-GGAGGAGGTAGCTGGCCTCGAGATAGTAAGTGAATCT
	#73	ATACCAGCTTATTCAATTGGG C GGGAGGGAGGGGA-GGAGGAGGTAGCTGG T CTCGAGATAGTAAGTGAATCT
	#1010	ATACCAGCTTATTCAATTGGG A GGGAGGG T GGGGA-GGAGGAGGTAGCTGGCCTCGAGATAGTAAGTGAATCT
	#35	ATACCAGCTTATTCAATTGGG C GGGAGGGAGGGGA-GGAGGAGGTAGCTGGCCT T AGATAGTAAGTGAATCT
	#134	ATACCAGCTTATTCAATTGGG A GGGAGGGAGGG TGT GGAGG T GG CC GCTGG T CT -T AGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe II	#138	ATACCAGCTTATTCAATTG --GGT GGG C GGGTGGGTGAATATGCTGAT T ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#37	ATACCAGCTTATTCAATTGG -GG CGGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT T ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#79	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGCGGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT T ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#105	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGCGGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT CT ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#137	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGCGGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT C ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#39	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGG T GGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT C ACCCACAGATAGTAAGTGAATCT
	#38	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGG A GGGTGGGTGGGTGAATATGCTGAT G CCCCACAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe III	#14	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTCG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTC C TAGATAGTAAGTGAATCT
	#75	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#710	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#131	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#107	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#108	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#310	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTCG AGACACTTACTAT C CACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
	#101	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTACTGG AGACACTTACTATCCCACTTACTCTCTCT T TAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe IV	#72	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTCA AGCACTACTTTCTCGACACTACTTACTTCTCT T AGATAGTAAGTGAATCT
	#711	ATACCAGCTTATTCAATTGC ACTCA AGCACTACTTTCTCGACACTACTTACTTCTCT T AGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe V	#132	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGACAGCAGATTT CG CGCTTGTGTTCTTTGGGGTGTAGATAGTAAGTGAATCT
	#133	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGACAGCAGATTT CG CGCTTGTGTTCTTTGGGGTGTAGATAGTAAGTGAATCT
	#135	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGACAGCAGATTT CG CGCTTGTGTTCTTTGGGGTGTAGATAGTAAGTGAATCT
	#77	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGACAGCAGATTT CG CGCTTGTGTTCTTTGGGGTGTAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe VI	#78	ATACCAGCTTATTCAATT --- CG - GGCCAGCTCTTACATTCTATCTCTCGAGGCCAGATAGTAAGTGAATCT
	#31	ATACCAGCTTATTCAATT CG ACGGGGCCAGCTCTTACATTCTATCTCTCGAGGCCAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe VII	#71	ATACCAGCTTATTCAATT AC GCCACTACCCATTATTGTCGAGGCCTGCTCCATTAGATAGTAAGTGAATCT
	#106	ATACCAGCTTATTCAATT AC GCCACTACCCATTATTGTCGAGGCCTGCTCCATTAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe VIII	#109	ATACCAGCTTATTCAATT AC ATCGAGAGGTTGACACTGCTCCTATCTTTCTCGGGCCAGATAGTAAGTGAATCT
Gruppe IX	#74	ATACCAGCTTATTCAATT CG AGGCCAGCCTTCCATGTGTCACCCTTTTATCGAGGCCAGATAGTAAGTGAATCT

Abb. 5.8: Aptamersequenzen

Dargestellt sind die Sequenzdaten von 32 verschiedenen Aptamerklonen. Aufgrund von Sequenzhomologien und konservierten Regionen wurden die Aptamere in Gruppen eingeteilt. Es konnten neun verschiedene Hauptgruppen erstellt werden.

- rot grün - Primerbindungsregion (AP10 / AP20 komplementär)
- schwarz - Kernregion der Aptamersequenz
- gelb - Position mit variierenden Basen innerhalb einer Sequenzgruppe

Durch Sequenzvergleiche ließen sich die 32 Aptamerklone eindeutig in neun Gruppen einordnen. Das zeigt, dass unter den gewählten Selektionskriterien eine spezifische Anreicherung einiger weniger Aptamere erfolgt war.

Alignment aller Gruppen			
Gruppe I	#1310	---GGGTGGGAGG---GAGGGGAGGAGGAGGTAGCT-GGCCTCG-----	38
Gruppe II	#137	-CGAGGCGGGTGG---GTGGTTGAATA-TGCTGATCACCCAC-----	39
Gruppe III	#75	GCACTACTGGAGA---CACTTACT--ATCCCACTTACTCTCTCTT-----	40
Gruppe IV	#72	GCACT-CAAGCAC---TACTTTCTCGACTACTTACT-TCTCT-----	39
Gruppe V	#132	-----CGAGGAC--AGCAGATTTCG-----CGCTTGTGTTTCTTGGGGTGT-----	40
Gruppe VI	#31	---CGACGGGGGC---CAGCTCTT-----CACATTCTATCTCTCGAGGCC-----	39
Gruppe VII	#71	--ACGCC-----CA-CTACC-----C-CATTAT-TGTCTCGAGGCCGTGCTCCATT	40
Gruppe VIII	#109	--ACATCGAGAGGTTGACA-CTGCT-----C-CTATCT-T-TCTCG-GGCC-----	39
Gruppe IX	#74	-----CGAGGCC---AGCCTTCATGTGTACCCTTT---TATCGAGGCC-----	39
Alignment der Gruppen I und II			
Gruppe I	#1310	--GGTGGGAGGGAGGGGAGGAGGAGGTAGCTGGCCTCG-	38
Gruppe II	#137	CGAGGCGGGTGGTGGT--GAATATGCTGATCACCCAC	39
		* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
(→ Konsensusmotiv 1: GGHGGWGGGWGGG)			
Alignment der Gruppen III, IV und VI			
Gruppe III	#75	GCACTACTGGAGACTTACT--ATCCCACTTACTCTCTCTT-----	40
Gruppe IV	#72	GCACT-CAAGCACTACTTTCTCGACTACTTACT-TCTCT-----	39
Gruppe VI	#31	---CGACGGGGCCAGCTCTT-----CACATTCTATCTCTCGAGGCC	39
		* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
(→ Konsensusmotiv 2: ACTTaCTMTCTCT)			
Alignment der Gruppen VI, VII, VIII und IX			
Gruppe VI	#31	---CGACG-GGGCCAGCTCTTACATTCTATCTCTCGAGGCC-----	39
Gruppe VII	#71	--ACGCC-----CACTACCCATTATGTCTCGAGGCCGTGCTCCATT	40
Gruppe VIII	#109	--ACATCGAGAGGTTGACTGCTCCTATCTT-TCTCG-GGCC-----	39
Gruppe IX	#74	CGAGGCCA---GCCTTCATGTGTACCCTTTTATCGAGGCC-----	39
		* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
(→ Konsensusmotiv 3: TcTCGAGGCC)			

Abb. 5.9: Sequenzalignments der Kernregion ausgewählter Aptamerklone

Durchgeführt wurden die Alignments mit Hilfe des Programmes *Clustal W*. Es wurden nur die Kernregionen der Aptamere ohne die definierten Primerbindungsgebiete dargestellt. Grau markierte Nukleotide wurden in mehreren oder allen Aptameren eines Alignments gefunden.

Die meisten Aptamerklone gehörten der Gruppe III (8 Einzelklone), der Gruppe II (7 Einzelklone) und der Gruppe I (5 Einzelklone) an. Zu Gruppe V ließen sich vier und zu den Gruppen IV, VI und VII jeweils zwei Klone zuordnen. Die Aptamerklone ApPilz #109 und ApPilz #74 waren zu keiner dieser Gruppen zuordenbar und wurden deshalb als eigene „Gruppe“ definiert. Die Gruppen untereinander wiesen kaum Ähnlichkeiten miteinander auf. Es konnte auch keine generelle Konsensussequenz ausgemacht werden. Größere Sequenzhomologien waren zwischen den Gruppen I und II (G-haltiger Bereich am Beginn der Kernregion, Konsensusmotiv 1) und den Gruppen III, IV und VI (C,T,A-haltiger Bereich am Ende der Kernregionen, Konsensusmotiv 2) erkennbar. Auch die Gruppen VI, VII, VIII und IX zeigten Bereiche vergleichbarer Sequenzabfolgen (Konsensusmotiv 3) (siehe Abb. 5.9). Gruppe V ähnelte keiner der anderen Gruppen.

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

Tab. 5.7: **Analyse der Basenzusammensetzung der Aptamersequenzen**

Dargestellt sind zum einen die Basenzusammensetzung der Primerbindungsstellen und zum anderen die der Kernregionen der Aptamere. Es wurde sowohl die Anzahl, als auch der prozentuale Anteil der einzelnen Basen an der jeweiligen Sequenz aufgelistet.

Basenzusammensetzung der Primerbindungsregion											
Primer- bindungsregion	Basenanzahl					ges.	Anteil in %				Base mit >25% Anteil
	A	C	G	T	A		C	G	T		
AP10	6	4	1	7	18	33,3	22,2	5,6	38,9	A + T	
AP20 komplementär	7	2	4	5	18	38,9	11,1	22,2	27,8	A + T	

Basenzusammensetzung der Aptamer Kernregion (ohne Primer)											
Aptamer	Basenanzahl					ges.	Anteil in %				Base mit >25% Anteil
	A	C	G	T	A		C	G	T		
Gruppe I											
#1310	6	4	24	4	38	15,8	10,5	63,2	10,5	G	
#73	6	4	24	4	38	15,8	10,5	63,2	10,5	G	
#1010	6	4	24	4	38	15,8	10,5	63,2	10,5	G	
#35	6	5	23	4	38	15,8	13,2	60,5	10,5	G	
#134	4	4	23	7	38	10,5	10,5	60,5	18,4	G	
Gruppe II											
#138	6	7	15	9	37	16,2	18,9	40,5	24,3	G	
#37	6	8	16	8	38	15,8	21,1	42,1	21,1	G	
#79	7	8	15	9	39	17,9	20,5	38,5	23,1	G	
#105	7	9	15	8	39	17,9	23,1	38,5	20,5	G	
#137	7	9	15	8	39	17,9	23,1	38,5	20,5	G	
#39	7	8	15	9	39	17,9	20,5	38,5	23,1	G	
#38	7	8	16	8	39	17,9	20,5	41,0	20,5	G	
Gruppe III											
#14	9	16	3	12	40	22,5	40,0	7,5	30,0	C + T	
#75	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
#710	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
#131	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
#107	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
#108	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
#310	9	14	3	14	40	22,5	35,0	7,5	35,0	C + T	
#101	9	14	4	13	40	22,5	35,0	10,0	32,5	C + T	
Gruppe IV											
#72	9	14	3	13	39	23,1	35,9	7,7	33,3	C + T	
#711	9	14	3	13	39	23,1	35,9	7,7	33,3	C + T	
Gruppe V											
#132	5	7	14	14	40	12,5	17,5	35,0	35,0	G + T	
#133	5	7	14	14	40	12,5	17,5	35,0	35,0	G + T	
#135	5	7	14	14	40	12,5	17,5	35,0	35,0	G + T	
#77	5	7	14	14	40	12,5	17,5	35,0	35,0	G + T	
Gruppe VI											
#78	5	13	8	9	35	14,3	37,1	22,9	25,7	C + T	
#31	6	14	10	9	39	15,4	35,9	25,6	23,1	C + G	
Gruppe VII											
#71	7	16	6	11	40	17,5	40,0	15,0	27,5	C + T	
#106	7	16	6	11	40	17,5	40,0	15,0	27,5	C + T	
Gruppe VIII											
#109	7	12	9	11	39	17,9	30,8	23,1	28,2	C + T	
Gruppe IX											
#74	6	14	9	10	39	15,4	35,9	23,1	25,6	C + T	

Zur weiteren Charakterisierung des selektierten Oligonukleotidpools wurden die individuellen Aptamere hinsichtlich ihrer Basenzusammensetzungen miteinander verglichen (siehe Tab. 5.7). Diese Analyse wurde mithilfe des Programms DNAsis (Version 2.5; Hitachi) durchgeführt. Der Vergleich der Basenzusammensetzung zeigte, dass die Aptamere der Gruppe I und II einen hohen Anteil an Guanin enthalten. In Gruppe I ist dieser Anteil mit >60 % besonders hoch. In den Oligonukleotiden der Gruppe V, sowie dem Aptamer ApPilz #31 wurden vor allem die Basen Guanin und Thymin (je 35 %) gefunden, während alle anderen untersuchten Aptamere reich an Cytosin und Thymin (je 25–40 %) waren.

5.1.2.2 Analyse der Sekundärstrukturen

Die Modellierung der möglichen Sekundärstruktur der Aptamere erfolgte unter Nutzung des im Internet frei verfügbaren Programms *mfold* (Version 3.1) (siehe Kap. 4.7.2). Dieses Programm führt eine Analyse der zweidimensionalen Struktur mit Hilfe der Energie-Minimierungs-Methode nach Michael Zuker (2003) aus. Bei der Faltung der Aptamere kann es zu Stems (doppelsträngige Bereiche), Loops (Ausschleifungen von einzelsträngigen Bereichen, wie Haarnadel- oder interne Schleifen) und Bulbs (kleine, einzelsträngige Ausbuchtungen in doppelsträngigen Bereichen) kommen. Mit dem Programm *mfold* werden die energetisch günstigsten Strukturvarianten berechnet. So wurde für je einen charakteristischen Klon pro Aptamergruppe die hypothetische Sekundärstruktur bei Standardbedingungen bestimmt (Bindungs-/ Faltungstemperatur: 21 °C; Ionenstärke des Puffers (BB+): $[Na^+]$ 100 mM / $[Mg^{2+}]$ 2 mM). Diese rein rechnerisch energetisch vorteilhaftesten Varianten sind in den Abbildungen 3.10 und 3.11 dargestellt. Darüber hinaus zeigt das Programm in bestimmten Fällen auch energetisch ungünstigere Strukturmodulationen auf (z.B. Variante 2 des Aptamers ApPilz #72). Welche der theoretisch möglichen Sekundärstrukturen in der Realität bei Bindung des Aptamers an sein Zielmolekül eingenommen wird, ist mit dieser Methode nicht sicher bestimmbar.

Die über Sequenzalignments gefundenen homologen Regionen zwischen den einzelnen Aptamergruppen wurden in den Abbildungen farbig markiert (Gelb = Konsensusmotiv 1; Violett = Konsensusmotiv 2; Blau = Konsensusmotiv 3). Bei den grün und rot gekennzeichneten Bereichen handelt es sich um die beiden Primerbindungsregionen.

Vergleicht man alle der angenommenen Sekundärstrukturen miteinander, sind keine generellen Gemeinsamkeiten erkennbar. Auch die gefundenen Konsensusmotive sind nicht in vergleichbaren Strukturen wiederzufinden.

So ist der G-haltige Bereich des Konsensusmotivs 1 (Gruppen 1 und 2) zwar weitestgehend in einem großen Loop enthalten, aber im Falle des Aptamers ApPilz #1310 (Gruppe I) nicht die gesamte Konsensussequenz. Ein Teil des Motivs findet sich in einem kleinen angrenzenden Stem (Siehe Abb. 5.10).

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

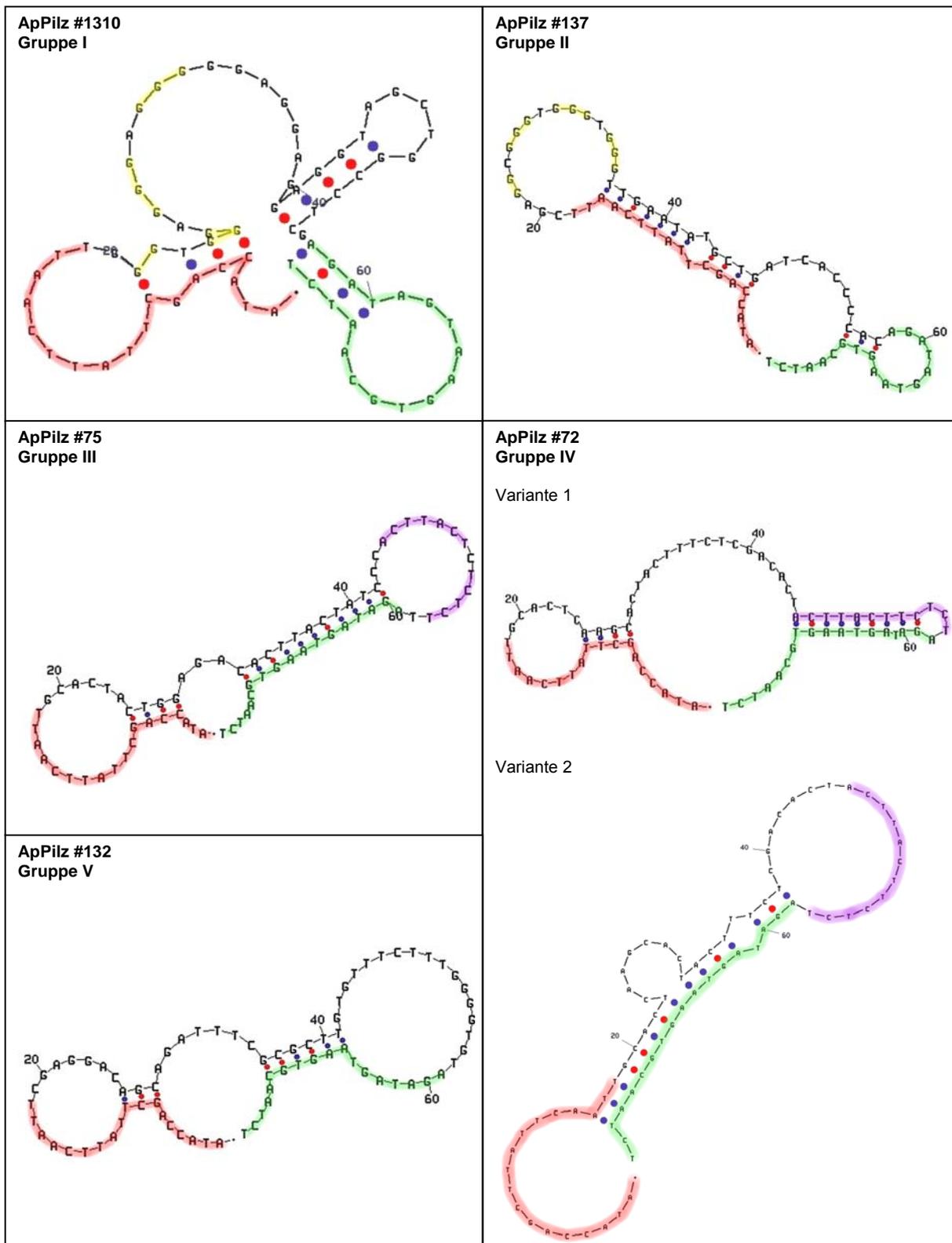


Abb. 5.10: **Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone**

Dargestellt sind die hypothetischen Sekundärstrukturen, errechnet durch das Programm *mfold* (Zucker & Turner). Gezeigt sind die energetisch günstigsten Strukturvarianten. Lediglich für Aptamer #72 wurde auch die energetisch zweitgünstigste Variante angegeben.

Rot (AP10) und grün (AP20 komplementär) markierte Bereiche entsprechen den Primerregionen. Mit gelb wurde das Konsensusmotiv 1, mit violett der Bereich des Konsensusmotivs 2 gekennzeichnet.

Auch im Falle des Konsensusmotivs 2 (Gruppen III und IV) können kaum Ähnlichkeiten aufgezeigt werden. Bildet sich bei ApPilz #75 (Gruppe III) im Bereich des Motivs ein Loop aus, so ist dieser bei der energetisch vorteilhaftesten Strukturvariante des Aptamers ApPilz #72 nicht festzustellen. Zieht man die energetisch weniger günstige Variation heran, ist die Sequenz zwar in einem Loop enthalten, dessen Form weicht aber von der des in ApPilz #75 gefundenen ab.

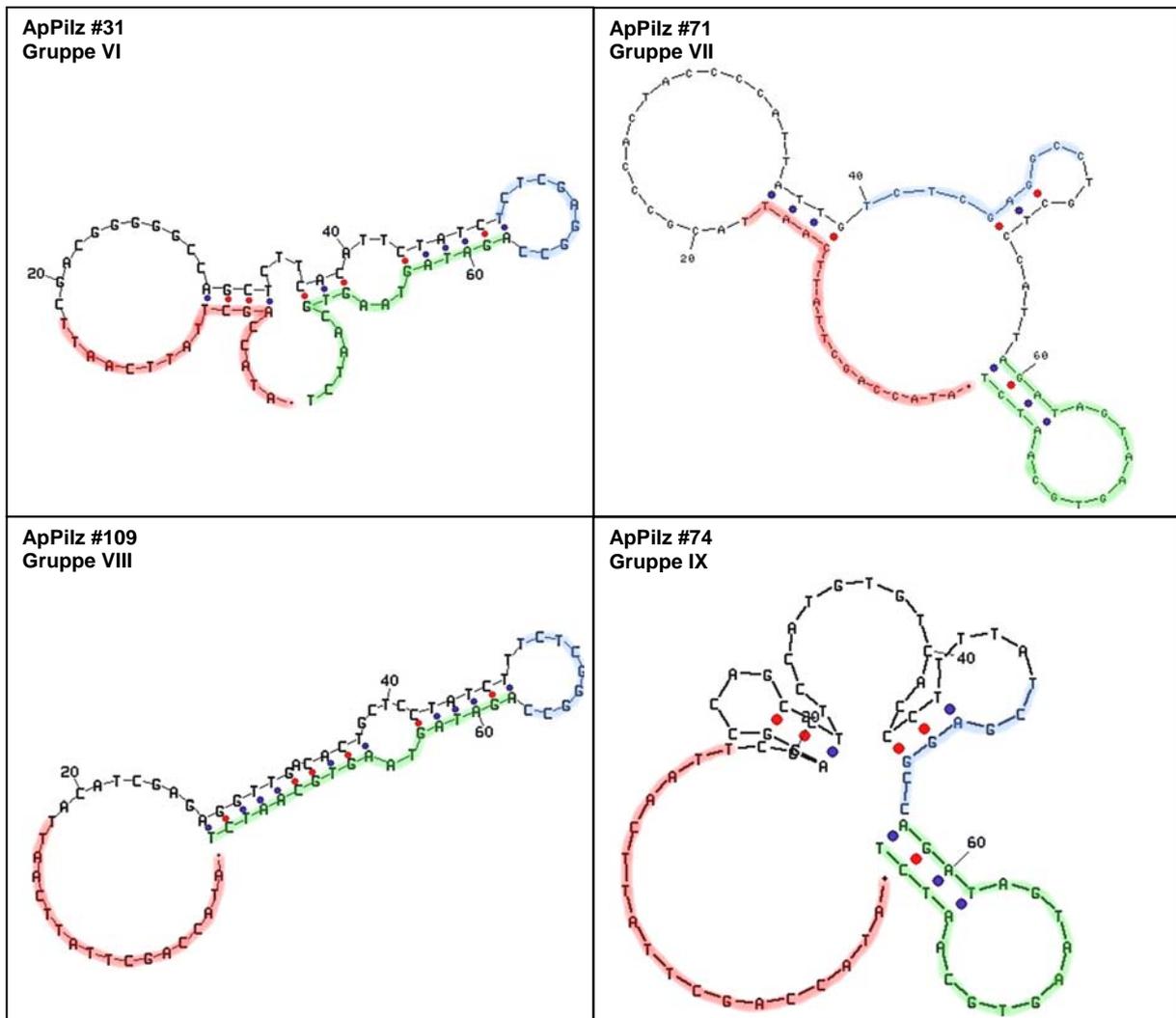


Abb. 5.11: **Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone**

Dargestellt sind die hypothetischen Sekundärstrukturen, errechnet durch das Programm *mfold* (Zuker & Turner). Gezeigt sind die energetisch günstigsten Strukturvarianten.

Rot (AP10) und grün (AP20 komplementär) markierte Bereiche entsprechen den Primerregionen. Das Konsensusmotiv 3 ist mit blau gekennzeichnet.

Die Konsensussequenz 3 wurde in vier Aptamergruppen gefunden (Gruppe VI, VII, VIII und IX). Die Aptamere der Gruppen VI (ApPilz #31) und VIII (ApPilz #109) zeigen eine sehr ähnliche Anordnung dieser Sequenz in einem kleinen Loop. Diese Form konnte jedoch für keine der beiden anderen dieses Motiv enthaltenden Gruppen (Gruppe VII: ApPilz #71 und Gruppe IX: ApPilz #74) nachgewiesen werden. Hier ist das Konsensusmotiv jeweils an der Ausbildung von Stem-Loop-Konstruktionen beteiligt, welche sich aber untereinander nicht ähneln (siehe Abb. 5.11).

5.1.3 Bindungsstudien mit individuellen Aptameren

Um die Bindungseigenschaften der selektierten Aptamere genauer bestimmen zu können, wurde nach der Sequenzanalyse und nachfolgenden Einteilung in Sequenzgruppen je ein charakteristischer Klon pro Aptamergruppe ausgewählt und dieser für verschiedene, vergleichende Bindungsversuche genutzt. Es wurden Untersuchungen mit immobilisiertem Target, Messungen im IAsys-Affinitätssensor und Affinitätsreinigungsversuche mit Hilfe der Aptamere durchgeführt.

5.1.3.1 Bindungsstudien mit immobilisierter löslicher Sporenfraktion

Die ersten Versuche zur näheren Charakterisierung des Bindeverhaltens der einzelnen Aptamergruppen wurden analog den Bedingungen in SELEX SP13 durchgeführt (siehe Kap. 4.8.1). Dazu wurde die lösliche Sporenfraktion von *Penicillium expansum* Sporen auf Epoxy-Beads immobilisiert und diese (Einsatz $\sim 10^8$ Target-Beads) mit dem jeweiligen Aptamer ($\sim 50\text{--}90$ pmol) inkubiert. Nach einer intensiven Waschung erfolgte die Elution der Bead-gebundenen ssDNA mittels Hitze (bei $80\text{ }^\circ\text{C}$). Die Menge der eluierten ssDNA wurde über eine Fluoreszenzmessung bestimmt. Zur Kontrolle wurden parallel auch Versuche mit Negativ-Beads (Epoxy-Beads, behandelt mit PBS und 1% Proteasehemmer; Einsatz $\sim 3 \times 10^7$ Negativ-Beads) in der gleichen Art und Weise ausgeführt. Hiermit sollte geklärt werden, ob sich trotz Negativselektion im SELEX SP13 Aptamere angereichert hatten, die andere, als Target nicht gewünschte Moleküle erkennen. Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche sind in Tabelle 5.8 und in Abbildung 5.12 zusammengestellt.

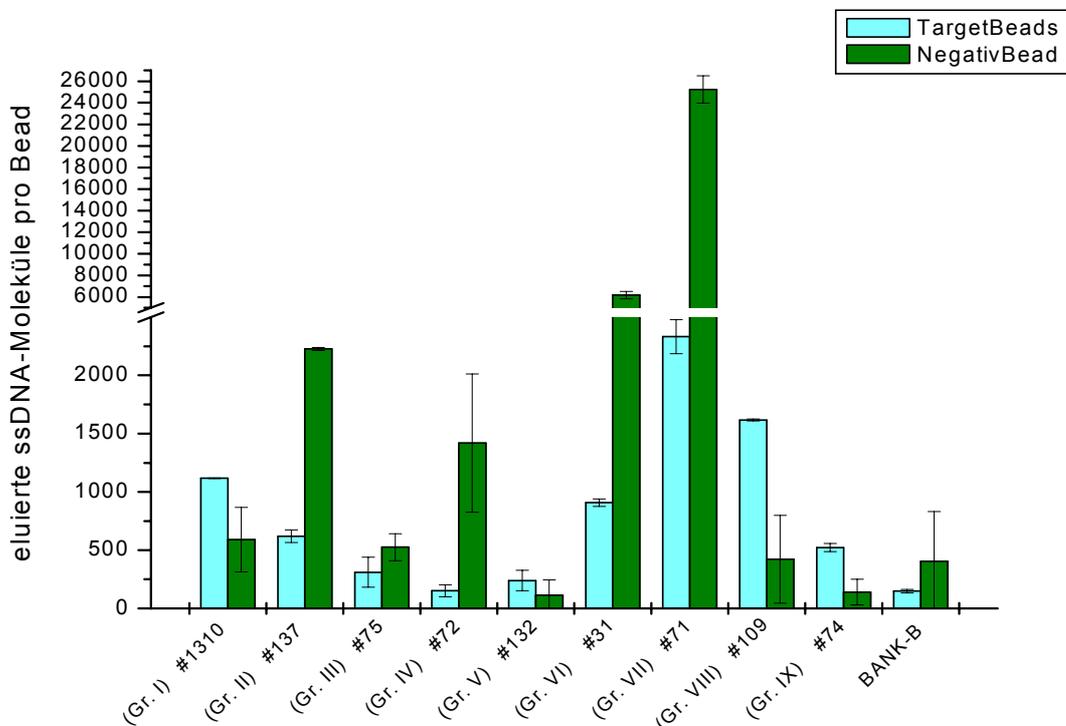


Abb. 5.12: Übersicht über die Bindungsversuche gruppenspezifischer Aptamerklone mit Target-Beads (*P.expansum*) bzw. Neagativ-Beads

Bindungsversuche mit Einzelklon-ssDNA an je $\sim 1 \times 10^8$ Target-Beads von *Penicillium expansum* Sporen (TargetBeads) und je $\sim 3 \times 10^7$ Negativ-Beads (Epoxy-Beads, behandelt mit PBS und 1% Proteasehemmer; NegativBeads), dargestellt als eluierte ssDNA-Moleküle pro Bead.

Tab. 5.8: Übersicht über die Bindungsversuche gruppenspezifischer Aptamerklone mit Target-Beads (*P.expansum*)

Für die Bindungsversuche wurden Target-Beads von *Penicillium expansum* Sporen (Targ) und Negativ-Beads (Epoxy-Beads, behandelt mit PBS und 1% Proteasehemmer; Neg*) mit dem jeweiligen Aptamer inkubiert. Nach einer Waschung wurde die Bead-gebundene ssDNA mittels Hitzeelution von den Beads eluiert und die Menge mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Es kamen jeweils $\sim 1 \times 10^8$ Target-Beads und $\sim 3 \times 10^7$ Negativ-Beads zum Einsatz. Die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter Moleküle pro Bead (Molekulargewicht für ein Oligonukleotid mit 76 Nukleotiden = 24852 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

Bindungsversuche individueller Aptamere mit Target-Beads (<i>P.expansum</i>) und Negativ-Beads				
		Ausgang-ssDNA [pmol]	eluierte ssDNA [pmol]	Moleküle / Bead
(Gruppe 1) #1310	Targ	51,0 ± 0,6	0,197 ± 0,000	1118 ± 2
	Neg*		0,024 ± 0,012	590 ± 277
(Gruppe 2) #137	Targ	64,2 ± 0,4	0,105 ± 0,008	620 ± 55
	Neg*		0,101 ± 0,000	2227 ± 13
(Gruppe 3) #75	Targ	62,7 ± 1,7	0,052 ± 0,020	311 ± 129
	Neg*		0,024 ± 0,004	526 ± 116
(Gruppe 4) #72	Targ	62,0 ± 0,1	0,024 ± 0,008	152 ± 52
	Neg*		0,064 ± 0,028	1421 ± 593
(Gruppe 5) #132	Targ	66,4 ± 2,2	0,254 ± 0,016	240 ± 88
	Neg*		0,028 ± 0,004	115 ± 132
(Gruppe 6) #31	Targ	73,6 ± 0,9	0,157 ± 0,004	908 ± 32
	Neg*		0,262 ± 0,012	6169 ± 332
(Gruppe 7) #71	Targ	91,3 ± 18,6	0,378 ± 0,024	2333 ± 146
	Neg*		1,195 ± 0,060	25235 ± 1259
(Gruppe 8) #109	Targ	83,7 ± 0,1	0,270 ± 0,000	1617 ± 8
	Neg*		0,020 ± 0,016	422 ± 377
(Gruppe 9) #74	Targ	66,0 ± 2,6	0,089 ± 0,004	522 ± 35
	Neg*		0,008 ± 0,004	141 ± 111
(Kontrolle) BANK-B	Targ	55,5 ± 1,1	0,024 ± 0,004	149 ± 15
	Neg*		0,016 ± 0,016	406 ± 426

Zunächst wurde festgestellt, dass die gemessenen Werte für die einzelnen Eluatfraktionen sehr gering waren. Diese Tatsache ist nicht verwunderlich angesichts der Vielzahl unterschiedlicher Zellbestandteile, die vermutlich auf den Target-Beads immobilisiert waren und der Wahrscheinlichkeit, dass die einzelnen Aptamere jeweils nur einen oder wenige dieser Bestandteile erkennen. So konnten bei einem Einsatz von 50–90 pmol Aptamer-DNA in den Versuchen nur $\sim 0,01$ – $0,38$ pmol wieder eluiert werden. Lediglich in einem Fall war eine etwas größere Menge ssDNA nachweisbar (ApPilz #71: $\sim 1,2$ pmol). Teilweise lagen die ermittelten Werte nahe der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse zeigen, dass die im SELEX SP13 selektierten Aptamere sowohl an die Target-Beads, als auch an die Negativ-Beads binden. In den Eluatfraktionen der Aptamere der Gruppen VI (ApPilz #31), VII (ApPilz #71) und IV (ApPilz #72) wurde deutlich mehr gebundene und wieder eluierte ssDNA für die Negativ-Beads nachgewiesen, als für die Target-Beads. So wurde für Aptamer ApPilz #31 etwa die siebenfache und für die Aptamere ApPilz #71 und ApPilz #72 die rund zehnfache Menge an Negativ-Bead-gebundener gegenüber Target-Bead-gebundener ssDNA pro Bead gefunden. Dieser Effekt war ebenfalls bei Einsatz der Aptamere ApPilz #137 (Gruppe II) und ApPilz #75 (Gruppe III) zu

beobachten. Auch hier wurde mehr Aptamer-DNA an die Negativ-Beads, als an die Target-Beads gebunden, allerdings nicht in einem so deutlichen Maße.

Die Aptamere der Gruppen I (ApPilz #1310), V (ApPilz #132), VIII (ApPilz #109) und IX (ApPilz #74) zeigten eine bessere Bindung an die Target-Beads als an die Negativ-Beads. So wurden für ApPilz #1310 und #132 mehr als die doppelte Anzahl an gebundenen (= eluierten) ssDNA-Molekülen pro Target-Bead gegenüber der Bindung an Negativ-Beads nachgewiesen. Deutlicher fielen die Ergebnisse bei Verwendung von ApPilz #109 und #74 aus. Hier überwog die Menge der gebundenen ssDNA-Moleküle pro Target-Bead gegenüber den Negativ-Beads um einen Faktor von circa vier.

Die äußerst geringen gemessenen Werte für die eluierten Fraktionen bei Aptamer #75 (Gruppe III), #132 (Gruppe V) und Aptamer #74 (Gruppe IX) lassen keine eindeutigen Aussagen über das Bindeverhalten dieser Aptamere zu.

5.1.3.2 Messungen im IAsys-Affinitätssensor

Mit dem IAsys-Affinitätssensor (Fa. NeoSensors Ltd.) ist es möglich, markierungsfrei und in Echtzeit Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen zu beobachten (siehe auch Kap. 4.8.3). Das Gerät ist als ein gerührtes Mikroküvetten-system aufgebaut, wobei ein Bindungspartner (Ligand) auf der Sensoroberfläche immobilisiert wird und anschließend die Bindung des zweiten Partners (Ligat) in Lösung verfolgt wird. Mit der Masseänderung an der Sensoroberfläche durch Assoziation bzw. Dissoziation ändert sich in dieser Schicht proportional der Brechungsindex. Die Änderungen des Resonanzwinkels werden mittels einer spezifischen Laser-Reflexion abgefragt (Resonant-Mirror-Spektroskopie). Gemessen wird dabei in Winkelsekunden (arc sec), wobei als Richtwert für planare Oberflächen eine Signaländerung von 600 arc sec einer Bindung von 1 ng Protein pro mm^2 entspricht (Sensoroberfläche einer Küvette = 16 mm^2 , Kirsten, 2001).

Für den Nachweis des Bindeverhaltens der einzelnen Aptamere wurden je ein charakteristischer Vertreter jeder Aptamergruppe biotinyliert und über eine Streptavidin-Kopplung auf die Biotin-Oberflächen der verwendeten Küvetten immobilisiert (siehe Kap. 4.8.3). Anschließend wurde die lösliche Sporenfraktion von *Penicillium expansum* Sporen ($32,7 \mu\text{g Protein/mL}$) in die Probenküvetten eingefüllt und die Bindung über einen Zeitraum von 5 min beobachtet. Die Änderungen des Resonanzwinkels wurden aufgezeichnet (Signal) (genaue Versuchsbeschreibung siehe Kap. 4.8.3). Die lösliche Sporenfraktion wurde, wie in Kapitel 4.2.3 (Zellaufschluss mittels Kugelmühle) beschrieben, hergestellt und lag in Bindungspuffer vor.

Die Aptamere der Gruppen VI und VII wurden in diese Versuche nicht mit einbezogen, da sie in den Bindungsstudien mit immobilisierter löslicher Sporenfraktion eine vergleichsweise stärkere Bindung an die Negativ-Beads zeigten (siehe Kap. 5.1.3.1).

Zusätzlich wurden Untersuchungen mit dem angereicherten Aptamerpool (ApPilzPoly) der achten Runde des SELEX SP13 und mit der Ausgangsbibliothek BANK-B als Negativkontrolle durchgeführt.

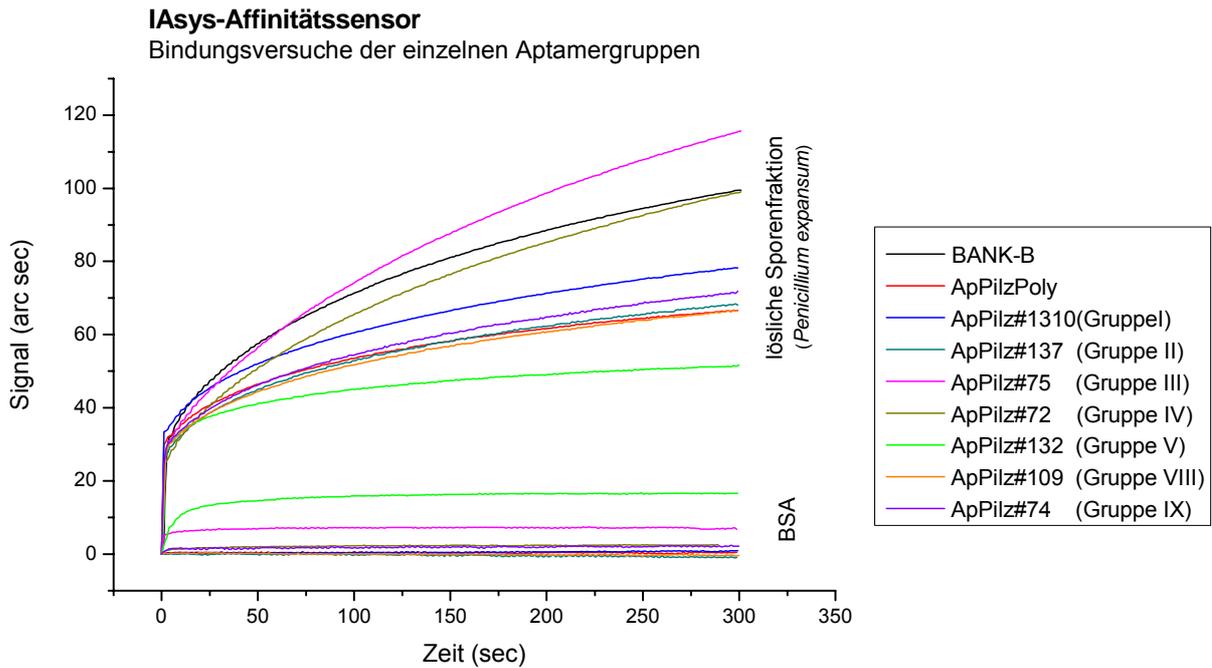


Abb. 5.13: **Übersicht über die Bindungsversuche ausgewählter Aptamergruppen im IASys-Affinitätssensor**

Bindungsversuche mit biotinylierter ssDNA verschiedener Aptamerklone, immobilisiert über Streptavidin auf einer Biotin-modifizierten Sensoroberfläche (Biotin-Küvette). Gezeigt sind die im IASys-Affinitätssensor erhaltenen Signaländerungen bei der Bindung der löslichen Sporenfraktion (32,5 µg/mL Protein) bzw. BSA (0,3 µM) an die immobilisierten Aptamere.

Die Abbildung 5.13 zeigt den Signalverlauf während der Bindungsreaktionen zwischen den immobilisierten Aptameren und der löslichen Sporenfraktion von *Penicillium expansum*. Auffällig war zunächst, dass nach Zugabe der Sporenfraktion zur Sensoroberfläche (Zeitpunkt 0 sec) ein deutlicher „Signal-Shift“ beobachtet wurde (25 – 37 arc sec). Dieser „Shift“ ist nicht auf eine Bindungsreaktion zurückzuführen, sondern wird durch eine Änderung des Messhintergrundes durch optisch aktive Bestandteile der löslichen Sporenfraktion (z.B. Zuckerbestandteile) verursacht, welche den Brechungsindex der Sensorschicht verändern. Da es sich bei der Sporenfraktion um den reinen löslichen Sporenextrakt handelt, ist ein hoher Zuckeranteil zu erwarten. Die eigentliche Bindung zwischen Aptamer und Sporenbestandteilen beginnt oberhalb des „Shifts“.

Alle untersuchten Aptamere zeigten eine Bindungsfähigkeit zu löslichen Sporenbestandteilen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Die stärkste Bindung konnte bei Aptamer #75, die schwächste bei Aptamer #132 nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den Bindungsversuchen mit der löslichen Sporenfraktion, sollte auch das Bindeverhalten der Aptamere zu einem Protein untersucht werden, welches nicht in den Sporen von Schimmelpilzen vorkommt, um die Spezifität der Aptamere für das komplexe Target zu prüfen. Für diese Versuche wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,3 µM eingesetzt. Die Bindung zu den einzelnen Aptameren wurde über einen Zeitraum von 5min erfasst. Die erhaltenen Kurven sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

Im Ergebnis konnte lediglich für ApPilz #132 eine Bindung zu BSA festgestellt werden. Alle anderen Aptamere zeigten keine oder kaum eine Affinität zu dem Protein.

In Abbildung 5.14 sind nochmals die Signaländerungen bei der Bindung zwischen ApPilz #132 und der löslichen Sporenfraktion einerseits und BSA andererseits abgebildet,

wobei für eine bessere Vergleichbarkeit der oben erwähnte „Shift“ bei der Bindungskurve der Sporenfraktion abgezogen wurde.

Es ist deutlich erkennbar, dass eine Bindung/Anlagerung sowohl von BSA als auch der Sporenfraktion an das Aptamer #132 erfolgt. Die Assoziationskurve für BSA zeigt einen steileren Anstieg als die für die Sporenfraktion und hat ihre Sättigung schneller erreicht. Es wurde jedoch in 5 min Bindungszeit eine stärkere Signaländerung für die löslichen Sporenbestandteile beobachtet als für BSA.

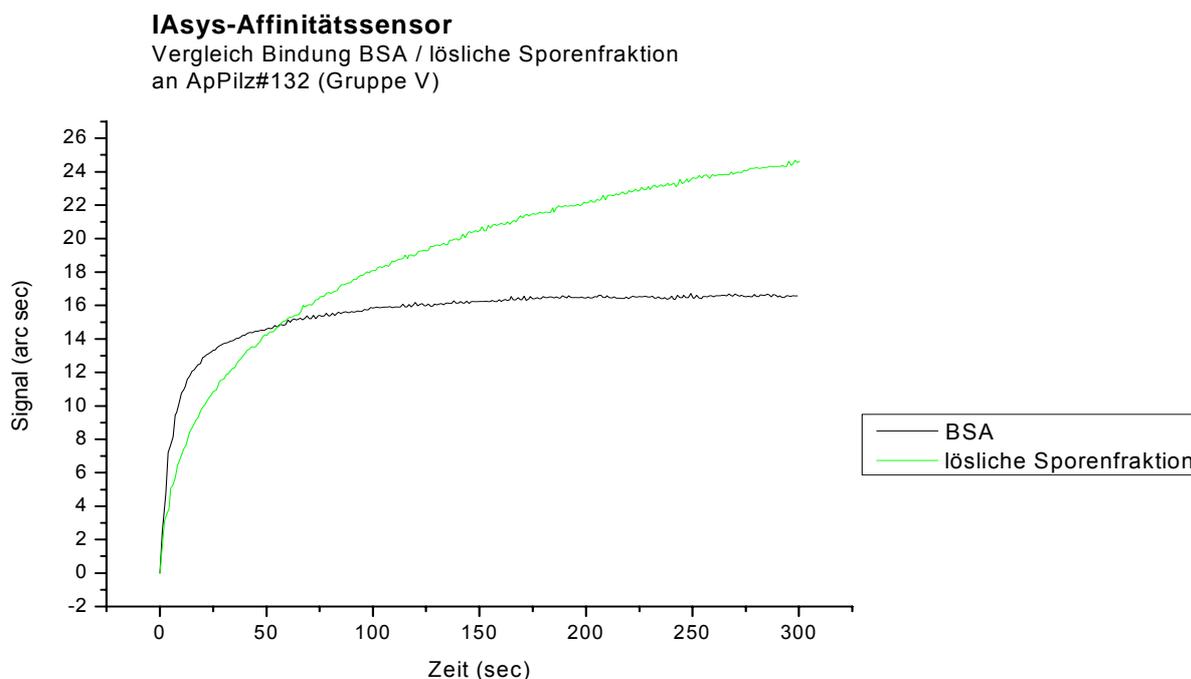


Abb. 5.14: **Bindung der löslichen Sporenfraktion und BSA an Aptamer #132 im IASys-Affinitätssensor**

Gezeigt sind die im IASys-Affinitätssensor erhaltenen Signaländerungen bei der Bindung der löslichen Sporenfraktion (32,5 µg/mL Protein) und BSA (0,3 µM) an das auf die Küvettenoberfläche immobilisiertes Aptamer #132 (Gruppe V). Der beobachtete „Signal-Shift“ nach Zugabe der löslichen Sporenfraktion wurde von der Bindungskurve abgezogen.

Zusätzlich zu den individuellen Aptameren wurde als Negativkontrolle auch die unselektierte Oligonukleotid-Bibliothek BANK-B auf der Sensoroberfläche immobilisiert und eine Bindungsreaktion mit der löslichen Sporenfraktion durchgeführt. Entgegen den Erwartungen wurde hier ebenfalls eine Bindungskurve aufgenommen, bei der die Signaländerungen mit denen der Aptamere vergleichbar waren. Das deutete auf eine eher unspezifische Bindung/Anlagerung der Sporenbestandteile hin. Um herauszufinden, ob sich Bestandteile der Sporenfraktion unspezifisch auf der Küvettenoberfläche ablagern und dieser Effekt die entstandenen Bindungskurven erklärt, wurden Kontrollversuche mit Küvetten mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen ohne Aptamerimmobilisierung durchgeführt. So wurden im IASys-Affinitätssensor Küvetten mit Biotin-, Amino- und Carboxylbeschichtung eingesetzt und die Signaländerungen nach Zugabe der löslichen Sporenfraktion für 10 min aufgezeichnet. Die resultierenden Kurven, dargestellt in Abbildung 5.15, zeigen, dass es sich wahrscheinlich tatsächlich um unspezifische Anlagerungen auf den Sensoroberflächen handelt. Für alle drei Küvettenoberflächen wurden Signale aufgezeichnet, die auf eine Anlagerung von Material aus der löslichen Sporenfraktion hinweisen. Zudem wurde auch hier der oben erwähnte „Signal-Shift“ (25 – 35 arc sec) beobachtet.

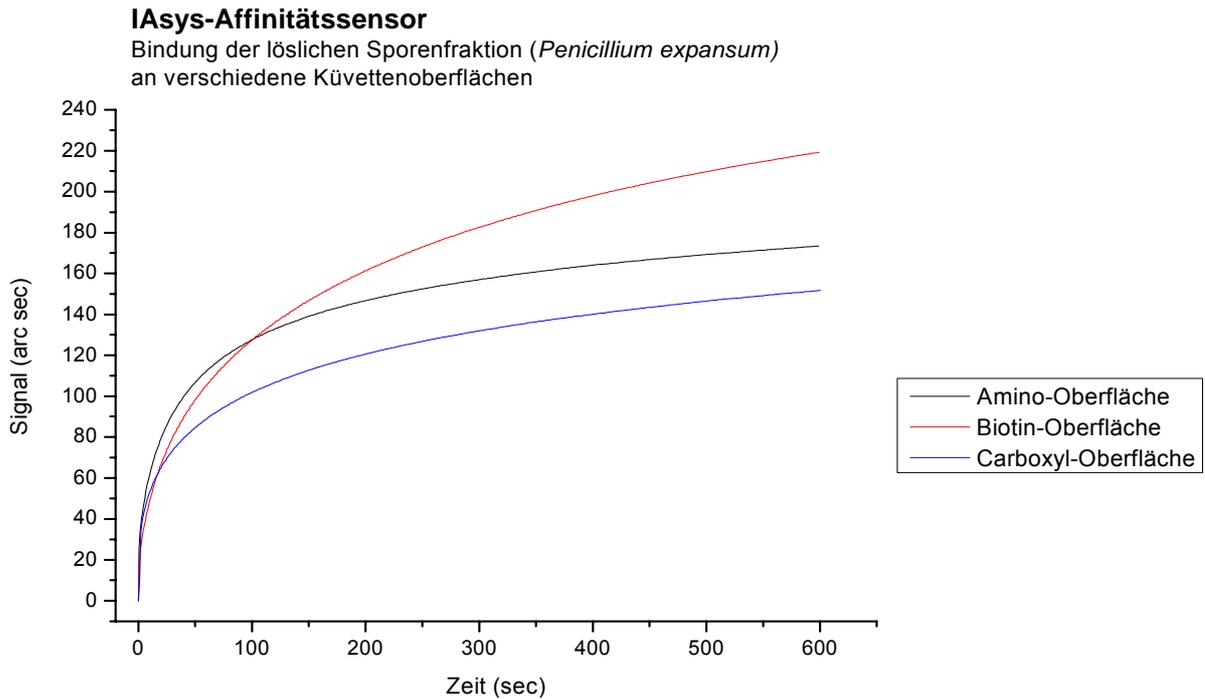


Abb. 5.15: Bindungsversuche an ausgewählten Küvettenoberflächen im IASys-Affinitätssensor

Gezeigt sind die im IASys-Affinitätssensor erhaltenen Signaländerungen bei der Bindung der löslichen Sporenfraktion (32,5 µg/mL Protein) an ausgewählte Küvettenoberflächen.

5.1.3.3 Affinitätsreinigung mit Aptameren

Eine andere Methode des Nachweises der Aptamer-Target-Bindung ist die Nutzung der Aptamere als Affinitätsmatrix zur Isolation des entsprechenden Targets aus einem komplexen Gemisch. Dazu wurden ausgesuchte Aptamere biotinyliert und je 2nmol über eine Biotin-Streptavidin-Kopplung auf je 10^9 Magnetic Beads (StrepBeads) immobilisiert (siehe Kap. 4.8.4). Diese Aptamer-Beads wurden mit der löslichen Fraktion von *Penicillium expansum* Sporen (Präparation siehe Kap. 4.2.3) zur Bindung (30 min, 21 °C) gebracht. Nach der Bindung wurde die Nichtbinderfraktion abgenommen und der Aptamer-Target-Komplex gründlich (fünfmal in Bindungspuffer) gewaschen. In der nachfolgenden Hitzeelution bei 80 °C erfolgte die Ablösung des gebundenen Zielmoleküls von den Aptamer-Beads. Die Eluate, die Protein-Bindungslösung (AL), die Nichtbinder- (NB) und die letzte Waschfraktion (W) wurden nach einer Fällung mit TCA in einer SDS-PAGE (10 %ige PAA-Gele, anschließende Coomassie-Färbung, siehe Kap. 4.4.3) analysiert. Vergleichend wurde in der Elektrophorese reines, nicht vorbehandeltes Streptavidin mitgeführt.

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Bindungsexperimente wurden für die Affinitätsreinigungsversuche folgende Aptamere ausgewählt (siehe auch Kap. 4.1.3): ApPilz #1310 (Gruppe I), ApPilz #75 (Gruppe III) und ApPilz #109 (Gruppe VIII). Zum Negativabgleich wurden äquivalente Versuche mit unbeschichteten, Streptavidin-modifizierten Magnetic Beads (StrepBeads) und mit Beads, die analog den Aptameren mit der Ausgangsbibliothek BANK-B beschichtet worden waren, durchgeführt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind in den Abbildung 5.16 dargestellt.

5.1 Aptamere für Schimmelpilzsporen

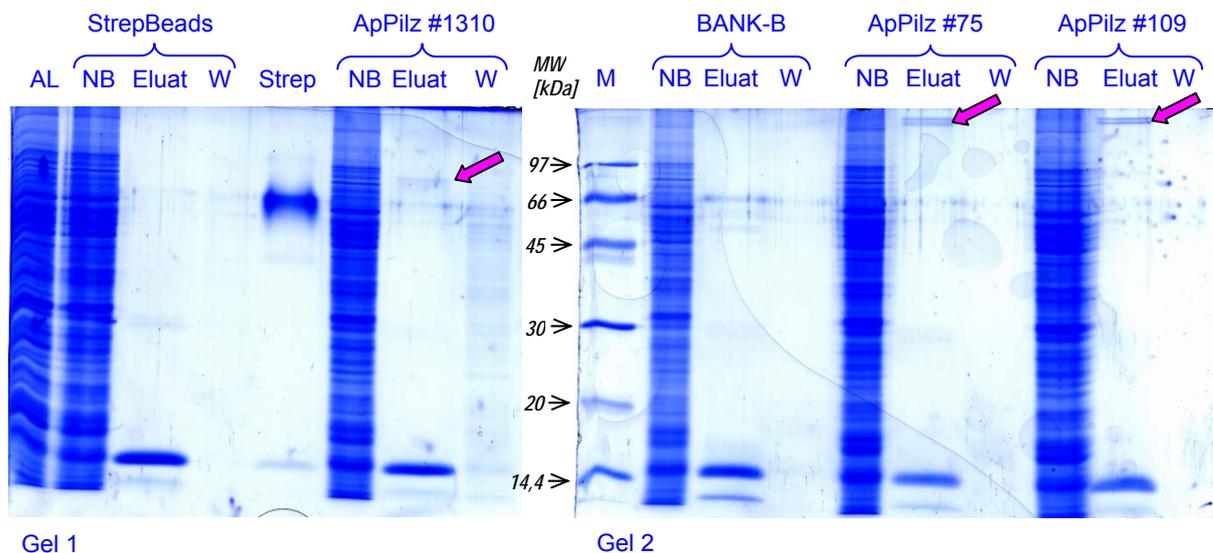


Abb. 5.16: **Affinitätsreinigung von Proteinen aus der löslichen Sporenfraktion von *Penicillium expansum* mittels Aptameren**

Für die Bindungsversuche wurden ausgewählte, biotinierte Aptamere auf Streptavidin-modifizierte Magnetic Beads (StrepBeads) immobilisiert und diese mit der löslichen Fraktion von *Penicillium expansum* Sporen zur Bindung gebracht. Die Nichtbinderfraktion (NB) wurde abgenommen, mehrere Waschschritte durchgeführt und die gebundenen Proteine mittels Hitzeelution bei 80°C von den Aptamer-Beads getrennt. Als Negativkontrolle wurden nach gleichem Protokoll Bindungsversuche mit Streptavidin-Beads (StrepBeads) und Beads mit immobilisierter Ausgangsbibliothek BANK-B durchgeführt. In der nachfolgenden SDS-PAGE (10 %ige PAA-Gele) wurden jeweils die Nichtbinderfraktion (NB), die letzte Waschfraktion (W) und die Eluate (Eluat) nach TCA-Fällung aufgetragen. Zum Vergleich wurden zusätzlich eine Probe der löslichen Sporenfraktion (AL), reines, unbehandeltes Streptavidin (Strep) und ein Proteinmarker (M) in der Elektrophorese mitgeführt. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine erfolgte anschließend mittels einer Coomassie-Färbung. Die Blockpfeile (pink) weisen auf affinitätsgereinigte Proteine hin.

Auf der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die lösliche Sporenfraktion (AL) aus einem komplexen Gemisch von Proteinen, verteilt über den gesamten dargestellten Molekulargewichtsbereich, besteht. Nach den Bindungsreaktionen zeigten die Nichtbinderfraktionen (NB) erwartungsgemäß ein ähnlich komplexes Bild. In den letzten Waschfraktionen (W) konnte dagegen kein oder nur ein geringer (ApPilz #1310) Proteinanteil festgestellt werden. Alle Eluatfraktionen zeigten zwei Proteinbanden im Bereich 13–15 kDa. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei diesen Banden um Monomere des Streptavidins. Auch beim Auftrag von reinem, unbehandeltem Streptavidin wurden diese Banden nachgewiesen, obgleich die Hauptbande hier folgerichtig in einer Größenordnung von ~66 kDa, dem Molekulargewicht des verwendeten, tetrameren Streptavidin (PROMEGA) lag.

In allen Eluatfraktionen war zudem eine Doppelbande im Bereich 26–29 kDa sichtbar. Am deutlichsten war diese bei der Verwendung von StreptavidinBeads. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass es sich dabei um Dimere von Streptavidin-Untereinheiten handelt.

Darüberhinaus konnten in den Elutionsfraktionen der verschiedenen Affinitätsreinigungsversuche zusätzliche, spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden. Im Eluat des Aptamers ApPilz #1310 (Gruppe I) war eine einzelne Proteinbande mit einer Größe von ~80 kDa erkennbar. Dagegen wurde beim Einsatz der Aptamere ApPilz #75 (Gruppe III) und #109 (Gruppe VIII) jeweils zwei Banden im höhermolekularen Bereich (> 120 kDa) gefunden. Alle Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei diesen Banden um einzelne, von den jeweiligen Aptameren spezifisch aus dem Proteingemisch (lösliche Sporenfraktion) isolierte Proteine handelt. Diese Isolierung erfolgte auf Grund der Affinität der einzelnen

Aptamere zu den jeweiligen Proteinen. Vergleichbare Banden waren in den Negativkontrollen (StrepBeads, BANK-B) nicht vorhanden.

5.2 Aptamere für Ethanolamin

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit sind Aptamere für ein besonders kleines molekulares Target, Ethanolamin. Es besitzt ein geringes Molekulargewicht und eine einfache chemische Struktur (siehe Kap. 3.3.2).

5.2.1 SELEX zur Gewinnung von Aptameren für Ethanolamin

Die Aptamere für Ethanolamin stammen aus einem SELEX-Prozess (SELEX1, SL1), der ursprünglich zur Selektion von Aptameren für β -Glucan (Laminarin) als definiertem Bestandteil der Schimmelpilzsporen durchgeführt wurde. Laminarin war auf Epoxy-Beads (Magnetic Beads mit funktionellen Epoxy-Gruppen) immobilisiert worden. Eventuell noch vorhandene freie Bindungsstellen der Epoxy-Bead-Oberfläche wurden durch Ethanolamin abgesättigt. Die genaue Herstellung dieser Laminarin-Beads ist in Kapitel 4.5.3.3 beschrieben. Der SELEX SL1 wurde gemäß der Beschreibung in Kapitel 4.5.4 durchgeführt. Als Ausgangsmaterial kamen 2 nmol der Oligonukleotid-Bibliothek BANK-A (96 nt) zum Einsatz. Pro Runde wurden 1×10^8 Laminarin-Beads eingesetzt. Der gesamte SELEX wurde in Bindungspuffer (siehe Kap. 4.1) ausgeführt. Die Bead-gebundene ssDNA wurde mittels Hitzeelution wieder von den Target-Beads getrennt. Ab der zweiten Runde wurde die gesamte eluierte, amplifizierte und anschließend aufgereinigte, Fluorescein-markierte ssDNA der Vorrunde genutzt (jeweils ~ 200 pmol). Es wurden sieben SELEX-Runden gefahren, ohne dass im Eluat ein nennenswerter Anstieg an selektierter ssDNA beobachtet werden konnte. Gemessen wurden in diesen Runden 0,019–0,162 pmol eluierte ssDNA, bzw. ca. 100–1000 eluierte Moleküle pro Bead. In der achten Runde wurde die Anzahl der eingesetzten Laminarin-Beads auf 5×10^8 erhöht. Trotzdem konnte keine größere Oligonukleotid-Menge eluiert werden (0,245 pmol bzw. 263 Moleküle pro Beads).

In Runde neun wurde die angereicherte ssDNA parallel

- mit 5×10^8 Ethanolamin-Beads (Ethanolamin, immobilisiert auf Epoxy-Beads, siehe Kap. 4.5.3.4, Versuch 9.1) und
- mit 5×10^8 Laminarin-Beads (Versuch 9.2) zur Bindung gebracht.

Hierbei wurde festgestellt, dass an den Ethanolamin-Beads 175 pmol bzw. $\sim 2 \times 10^5$ Moleküle pro Bead gebunden hatten, während von den Laminarin-Beads erneut nur äußerst geringe ssDNA-Mengen (am Nachweislimit liegend) eluiert werden konnten.

Zur näheren Überprüfung wurde der angereicherte ssDNA-Pool aus dem Versuch 9.1 in einer weiteren Runde parallel

- mit Epoxy-Beads (Versuch 10.1),
- mit Ethanolamin-Beads auf Basis von Epoxy-Beads (Versuch 10.2) und
- mit Ethanolamin-Beads auf Basis von Tosyl-Beads (Versuch 10.3) inkubiert.

Mit diesem Versuch sollte ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Anreicherung für die Partikel-Matrix stattgefunden hatte. Im Ergebnis zeigte sich, dass eine Erkennung

5.2 Aptamere für Ethanolamin

von Ethanolamin durch den angereicherten Oligonukleotidpool erfolgt war, nicht aber gegen die Immobilisierungsmatrix. Es fand nahezu keine Bindung an die Epoxy-Beads statt (0,2 pmol eluierte ssDNA). Ethanolamin wurde erkannt, unabhängig davon, auf welche funktionalisierte Partikeloberfläche es immobilisiert war. So wurden von den „Ethanolamin-Epoxy-Beads“ ~40 pmol und von den „Ethanolamin-Tosyl-Beads“ ~20 pmol (jeweils $\sim 2 \times 10^5$ Moleküle pro Bead mit Hitze) eluiert.

Die Menge der eluierten fluoreszenzmarkierten ssDNA der einzelnen SELEX-Runden und der Kontrollversuche sind in Tabelle 5.9 und Abbildung 5.17 dargestellt.

Tab. 5.9: **Ergebnisse SELEX SL1**

Ergebnisse des SELEX SL1, durchgeführt mit Laminarin-Beads, deren freie Bindungsstellen mit Ethanolamin geblockt waren, als Target. Abweichend davon kamen in einzelnen Runden andere Beads zum Einsatz. Diese wurden wie folgt bezeichnet:

* Ethanolamin-Epoxy-Beads

** Epoxy-Beads

*** Ethanolamin-Tosyl-Beads.

Die eingesetzte Bead-Zahl, die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA (bestimmt über Fluoreszenzmessungen) wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter ssDNA-Moleküle pro Bead (für ein Oligonukleotid mit 96 Nukleotiden = 31392 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

	SELEX 1 / SL1 (Laminarin-Beads)					
	Bead-Zahl [10 ⁸]	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		eluierte Moleküle pro Bead
		[µg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
Runde 1 (R1)	1,06	61,5	1959	23,4	0,75	$4,2 \times 10^3$
Runde 2 (R2)	1,04	10,4	341	1,1	0,04	$2,0 \times 10^2$
Runde 3 (R3)	1,18	9,2	293	4,0	0,13	$6,4 \times 10^2$
Runde 4 (R4)	1,13	8,1	258	1,4	0,04	$2,3 \times 10^2$
Runde 5 (R5)	1,03	8,6	274	5,1	0,16	$9,5 \times 10^2$
Runde 6 (R6)	1,08	7,9	252	3,5	0,11	$6,2 \times 10^2$
Runde 7 (R7)	1,17	7,4	236	0,6	0,02	$9,8 \times 10^1$
Runde 8 (R8)	5,61	4,3	137	7,7	0,25	$2,6 \times 10^2$
Runde 9 (R9.1)*	5,21	7,9	252	5506	175	$2,0 \times 10^5$
Runde 9 (R9.2)	4,88	2,3	73	2,2	0,07	$8,6 \times 10^1$
Runde 10 (R10.1)**	1,11	6,6	210	6,4	0,20	$1,1 \times 10^4$
Runde 10 (R10.2)*	0,94	6,6	210	1272	40,5	$2,6 \times 10^5$
Runde 10 (R10.3)***	0,60	4,3	137	632	20,2	$2,0 \times 10^5$

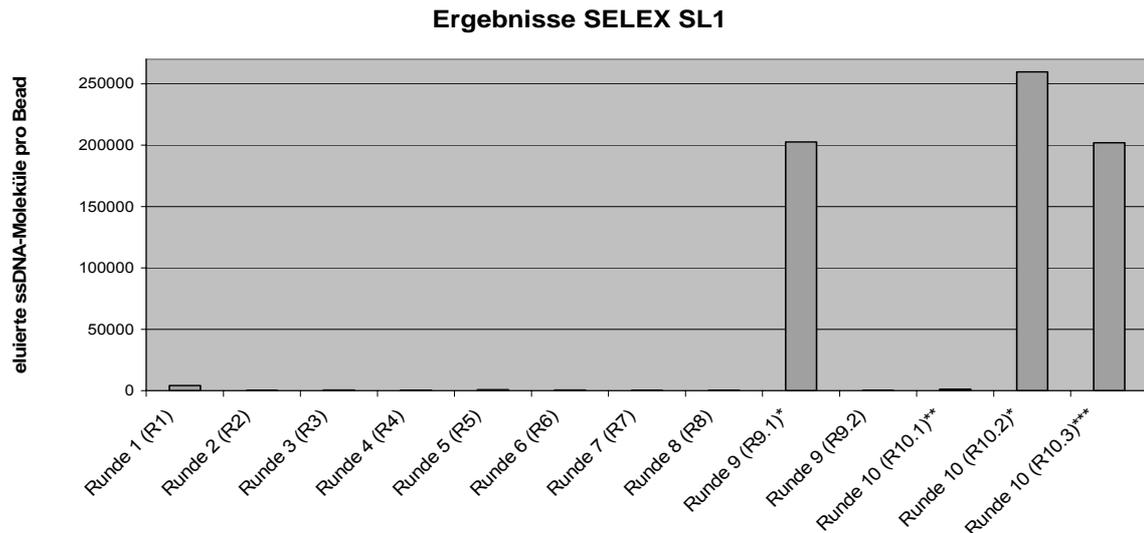


Abb. 5.17: **Ergebnisse SELEX SL1**

Ausbeute an eluierter ssDNA je SELEX-Runde, dargestellt als Molekülzahl pro Bead.

Durchgeführt wurde der SELEX mit Laminarin-Beads. Abweichend davon:

- * Ethanolamin-Epoxy-Beads (R9.1; R10.2)
- ** Epoxy-Beads (R10.1)
- *** Ethanolamin-Tosyl-Beads (R10.3).

Diese Daten lassen darauf schließen, dass eine Selektion und Anreicherung von Aptameren nicht für Laminarin, wohl aber für Ethanolamin erfolgt war. Auch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass keine unspezifische Anreicherung für das Matrixmaterial (Epoxy-Beads) stattgefunden hatte. Unter den angewandten SELEX-Bedingungen konnte somit eine Bindungskapazität der Ethanolamin-Beads von ca. 2×10^5 ssDNA Moleküle/Bead erreicht werden. Erfahrungen bei vorangegangenen SELEX-Prozessen wiesen darauf hin, dass damit die Bindungskapazität der verwendeten magnetischen Beads ausgeschöpft war (Stoltenburg & Strehlitz, 2003; Stoltenburg, persönliche Mitteilung). Daher wurde auf eine weitere Fortsetzung der *in vitro* Selektion verzichtet und der SELEX abgebrochen. Im angereicherten Aptamerpool befanden sich nun verschiedene ssDNA-Moleküle, die unterschiedliche Bindungseigenschaften für das Target Ethanolamin aufwiesen. Um daraus die individuellen Sequenzen identifizieren und charakterisieren zu können, wurde der angereicherte ssDNA-Pool nach dem elften Zyklus mittels Klonierung vereinzelt. In dieser elften und letzten Runde (siehe auch Kap. 4.5.4 wurde nur ein Teil der einsatzfähigen ssDNA genutzt, um noch Ausgangs-Material für spätere SELEX-Versuche zur Verfügung zu haben. So wurden ~ 115 pmol eluierte, amplifizierte und aufgearbeitete ssDNA aus Versuch 10.2 (s.o.) mit 10^8 „Ethanolamin-Epoxy-Beads“ zur Bindung gebracht. Nach der Entfernung der ungebundenen DNA-Moleküle und der Hitzeelution wurde die eluierte ssDNA in einer PCR mit den unmodifizierten Primern AP10 und AP20 amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschließend in einen geeigneten Vektor (pCR2.1-TOPO; INVITROGEN) kloniert und in *E.coli* DH5 α -T1 transformiert (siehe Kap. 4.6.1). Insgesamt wurden 50 der Transformanten mittels Kolonie-PCR hinsichtlich des Plasmids und des eingebauten Inserts kontrolliert (siehe Kap. 4.6.2).

Es wurde festgestellt, dass 41 der 50 untersuchten Transformanten ein Plasmid mit einem Insert in der erwarteten Größe enthielten. In den übrigen neun konnte kein Insert oder keines in der erwarteten Größe identifiziert werden. Aus der Kolonie-PCR ging zudem

hervor, dass bei allen positiven Transformanten die zu klonierenden DNA-Fragmente in einer bevorzugten Einbaurichtung (Aptamer-DNA auf dem (-)Strang) in die Plasmid-DNA eingebaut wurden. Die pDNA der 41 positiven Transformanten wurde präpariert und für eine Charakterisierung der eingebauten Aptamer-Inserts einer Auftragssequenzierung übergeben.

5.2.2 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde von der Firma AGOWA GmbH, Berlin durchgeführt (siehe Kap. 4.7.1). Für die Sequenzierreaktion wurde speziell präparierte pDNA der einzelnen Klone eingesetzt (Präparation mittels ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘, QIAGEN, siehe Kap. 4.6.3), wobei ein Primer gewählt wurde, der die Sequenzierung des relevanten Stranges mit der Aptamer-DNA erlaubte. Zur Absicherung der erhaltenen Daten wurden anschließend auch die entsprechenden Gegenstränge sequenziert. Durch die bekannten Primerbindungsregionen (AP10, AP20_{komplementär}) am 5'- und 3'-Ende der Aptamer-DNA konnte diese in der ermittelten Basenabfolge der einzelnen Klone eindeutig identifiziert werden.

5.2.2.1 Einteilung der Sequenzen nach Primärstruktur

Von den 41 zur Verfügung stehenden Klonen konnte für 37 Klone eine eindeutige Sequenz ermittelt werden (siehe Abb. 5.18). Dabei wurde festgestellt, dass alle Aptamersequenzen 96 Nukleotide enthielten, mit Ausnahme des Aptamers #14.4, welches aus 70 Nukleotiden bestand und Aptamer #2.9 mit einer Größe von 95 Nukleotiden. Die Anzahl von 96 Nukleotiden entspricht der Größe der eingesetzten BANK-A.

Durch multiple Sequenzalignments, die mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms Clustal W durchgeführt wurden (siehe Abb. 5.19), konnten die Aptamere in sieben Hauptgruppen aufgeteilt werden (siehe Tab. 5.10). Identische Aptamere wurden in Untergruppen eingeteilt.

Die Diversität des Pools war nach 10 Selektionsrunden stark minimiert worden. Die Mehrheit (ca. 86 %) aller selektierten Klone gehörten zu den Sequenzfamilien (Hauptgruppen) I oder II. Die Mitglieder innerhalb einer dieser hoch konservierten Familien unterschieden sich nur in einzelnen Basenpositionen. Sie wiesen eine gemeinsame Guanin-reiche konservierte Region von 16 Basen am 5'-Ende der Kernregion auf (Gruppe I: Position 20-35 und Gruppe II: Position 24-39). Dieser charakteristische Bereich (Konsensus-Sequenz: **GAGGYGGGTGGGTGGG**) bestand aus vier Guanin-Triplets, welche jeweils durch ein Thymin-Nukleotid unterbrochen wurden; innerhalb des ersten Triplets war ein Adenin-Nukleotid enthalten. Diese Region könnte auf eine markante und essentielle räumliche Struktur der DNA hindeuten, die für die Bindung des Aptamers an das Target eine Schlüsselfunktion einnimmt. Die große Anzahl weitgehend identischer Sequenzen (Gruppe I → 21 bzw. Gruppe II → 11; siehe auch Tab. 5.10) deutete bereits auf eine erfolgreiche Selektion Target-spezifischer Aptamere hin. Die Klone der Gruppen III-VII glichen sich untereinander nicht. Klon #14.5 (Gruppe IV) birgt am 5'-Ende der Kernregion einen Bereich, der der konservierten Guanin-reichen Region der Gruppe I und II ähnelt. Darüber hinaus wurde die Konsensus-Sequenz in keiner der anderen Sequenzen gefunden. Auch sonst konnten bei den Sequenzen der Gruppen III – VII keine nennenswerten Gemeinsamkeiten mit den Gruppen I und II festgestellt werden (siehe Abb. 5.19).

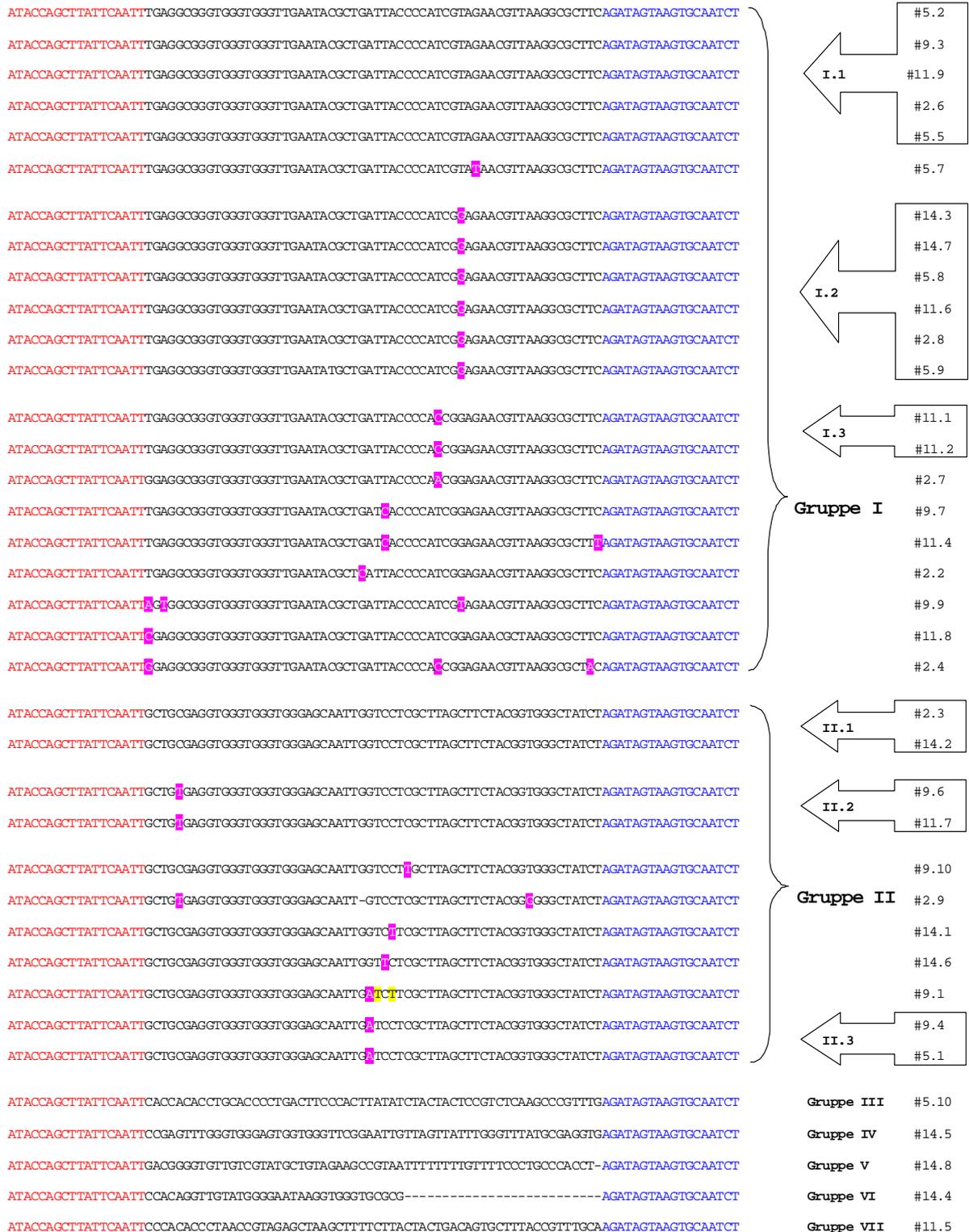


Abb. 5.18: Aptamersequenzen

Dargestellt sind die Sequenzdaten von 37 verschiedenen Aptamerklonen. Aufgrund von Sequenzhomologien und konservierten Regionen wurden die Aptamere in Gruppen eingeteilt. Es konnten sieben verschiedene Hauptgruppen erstellt werden, die teilweise noch in Untergruppen aufgeteilt wurden.

- rot blau - Primerbindungsregion (AP10 / AP20 komplementär)
- schwarz - Kernregion der Aptamersequenz
- rosa - Position mit variierenden Basen innerhalb einer Sequenzgruppe
- gelb - Base, die auch nach Sichtung des Gegenstranges nicht eindeutig bestimmt werden konnte

Tab. 5.10: Übersicht über die Einteilung der Aptamere des SELEX SL1 in Haupt- und Untergruppen

Gruppenbezeichnung	Anzahl der Untergruppen	Anzahl an Aptameren insg.	Bezeichnung der Untergruppe	Anzahl identischer Sequenzen
I.	3	21	I.1	5
			I.2	6
			I.3	2
II.	3	11	II.1	2
			II.2	2
			II.3	2
III.		1		
IV.		1		
V.		1		
VI.		1		
VII.		1		

Alignment aller Gruppen

```

Gr.I #14.3 ----TGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAAT--ACGCTGATTACCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTCT 60
Gr.II #9.4 -GCTGCGAGGTGGGTGGGTGGGAGCAATTGATCCTCGCTTAGCTTCTACGGTGGGCTATCT----- 60
Gr.III #5.10 CACCACACCTGCACCCCTGACTTCCCACTTATATCTACTACTCCGTCTCAAGCCCGTTTG----- 60
Gr.IV #14.5 ---CCGAGTTTGGGTGGGAGTGGTGGGTTTCGGAAATGTTAGTTATTTGGGTTTATGCGAGGTG---- 60
Gr.V #14.8 ---GACGGGCTGT-TGTC-GTATGCTGTAGAAGCC-GTAATTTTTTTTGTTTTCCCTGCCACCT-- 59
Gr.VI #14.4 --CCACAGGTTGTATGGG-GAATAAGGTGGGTGC--GCG----- 34
Gr.VII #11.5 -CCCACACCCTAACCCTA-GAGCTAAGCTTTTCTTACTACTGACAGTGCTTTACCGTTTGCA----- 60
    
```

Alignment der Gruppen I, II und IV

```

Gr.I #14.3 -----TGAGGCGGGTG-GGTGGGTTGAATACGCTGATTACCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC 60
Gr.II #9.4 ---GCTGCGAGGTGGGTG-GGTGGGAGCAATTGATCCTCGCTTAGCTTCTACGGTGGGCTATCT---- 60
Gr.IV #14.5 CCGAGTTTG-GGTGGGAGTGGTGGGTTTCGGAAATGTTAGTTATTTGGGTTTATGCGAGGTG----- 60
          * * * * * * * * * * *
    
```

Alignment der Gruppen I und II

```

Gr.I.1 #11.9 ----TGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAATACGCTGATTACCCATCGTAGAACGTTAAGGCG CTTC 60
Gr.I.2 #14.3 ----TGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAATACGCTGATTACCCATCGGAGAACGTTAAGGCG CTTC 60
Gr.I.3 #11.1 ----TGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAATACGCTGATTACCCACCGGAGAACGTTAAGGCG CTTC 60
Gr.II.1 #2.3 GCTGCCAGGTGGGTGGGTGGGAGCAAT-TGGTCCTCGCTTAGCTTCT--ACGGTGGGCTA TCT- 60
Gr.II.3 #9.4 GCTGCCAGGTGGGTGGGTGGGAGCAAT-TGATCCTCGCTTAGCTTCT--ACGGTGGGCTA TCT- 60
Gr.II.2 #9.6 GCTGTGAGGTGGGTGGGTGGGAGCAAT-TGGTCCTCGCTTAGCTTCT--ACGGTGGGCTA TCT- 60
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
-Konsensus-Sequenz (GAGGYGGGTGGGTGGG)-
    
```

Abb. 5.19: Sequenzalignments der Kernregion ausgewählter Aptamerklone

Durchgeführt wurden die Alignments mit Hilfe des Programmes *Clustal W*. Es wurden nur die Kernregionen der Aptamere ohne die definierten Primerbindungsgebiete dargestellt. Grau markierte Nukleotide wurden in mehreren oder allen Aptameren eines Alignments gefunden. **Fett** gedruckte Buchstaben markieren die Nukleotide des Konsensusbereiches der Gruppen I und II.

Eine weitere Möglichkeit, die Primärstruktur der aus BANK-A selektierten Aptamere zu charakterisieren, bestand im Vergleich der Basenzusammensetzung jeder Sequenz. Diese wurde mithilfe des Programms DNAsis (Version 2.5; Hitachi) ermittelt.

Tab. 5.11: Analyse der Basenzusammensetzung der Aptamersequenzen

Dargestellt sind zum einen die Basenzusammensetzung der Primerbindungsstellen und zum anderen die der Kernregionen der Aptamere. Es wurde sowohl die Anzahl, als auch der prozentuale Anteil der einzelnen Basen an der jeweiligen Sequenz aufgelistet.

Basenzusammensetzung der Primerbindungsstellen										
Primerbindungs-region	Basenanzahl					Anteil der Basen in %				Basen mit Anteil >30%
	A	C	G	T		A	C	G	T	
AP10	6	4	1	7		33,3	22,2	5,5	38,8	A + T
AP20(kompl)	7	2	4	5		38,8	11,1	22,2	27,7	A
Basenzusammensetzung der Aptamer-Kernregionen										
Aptamer	Basenanzahl					Anteil der Basen in %				Basen mit Anteil >30%
#5.2 (I.1)	12	12	21	15		20	20	35	25	G
#5.7	12	12	20	16		20	20	33,3	26,6	G
#14.3 (I.2)	12	12	22	14		20	20	36,6	23,3	G
#11.1 (I.3)	12	13	22	13		20	21,6	36,6	21,6	G
#2.7	13	12	23	12		21,6	20	38,3	20	G
#9.7	12	13	22	13		20	21,6	36,6	21,6	G
#11.4	12	12	22	14		20	20	36,6	23,3	G
#2.2	12	13	21	14		20	21,6	35	23,3	G
#9.9	12	12	21	15		20	20	35	25	G
#11.8	12	14	22	15		20	23,3	36,6	20	G
#2.4	13	13	23	11		21,6	21,6	38,3	18,3	G
#2.3 (II.1)	7	12	24	17		11,6	20	40	28,3	G
#9.6 (II.2)	7	11	24	18		11,6	18,3	40	30	G
#9.10	7	11	24	18		11,6	18,3	40	30	G
#2.9	7	11	24	17		11,8	18,6	40,6	28,8	G
#14.1	7	11	24	18		11,6	18,3	40	30	G
#14.6	7	11	24	18		11,6	18,3	40	30	G
#9.1	8	11	23	18		13,3	18,3	38,3	30	G
#9.4 (II.3)	8	12	23	17		13,3	20	38,3	28,3	G
#5.10 (III)	12	26	6	16		20	43,3	10	26,6	C
#14.5 (IV)	8	4	26	22		13,3	6,6	43,3	36,6	G + T
#14.8 (V)	8	13	15	23		13,5	22	25,4	38,9	T
#14.4 (VI)	7	5	15	7		20,5	14,7	44,1	22,5	G
#11.5 (VII)	14	19	9	18		23,3	31,6	15	30	C

5.2 Aptamere für Ethanolamin

Die Basenzusammensetzung zeigt eindeutig, dass bei allen Sequenzen, bis auf die der Klone #14.8, #11.5 und #5.10 der Guanin-Anteil der Kernregion über 30 % beträgt. Besonders augenscheinlich ist dies der Fall bei den Sequenzen, die die Guanin-reiche Konsensus-Sequenz enthalten.

Bei der Auswertung der Sequenzen des hier vorgestellten SELEX SL1 und des SELEX SP13 aus Kap. 5.1.1.3 (durchgeführt für die Gewinnung von Aptameren für die lösliche Fraktion von Schimmelpilz-Sporen), fiel die augenscheinliche Ähnlichkeit der Einzelklone der Gruppe I des SELEX SL1 und der Gruppe II des SELEX SP13 auf (siehe Kap. 5.1.2.1).

Alignment der Gruppe I des SELEX SL1 und der Gruppe II des SELEX SP13			
SL1 #14.3	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #2.2	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTCATTACCCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #9.7	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATCACCACATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #11.4	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATCACCACATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #5.2	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCATCGTAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #5.7	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCATCGTATAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #9.9	A	TGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCATCGTAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #11.8	C	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #2.7	G	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCAACGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #11.1	T	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCAACGGAGAACGTTAAGGCGCTTC	60
SL1 #2.4	G	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATACGCTGATTACCCCAACGGAGAACGTTAAGGCGCTAC	60
SP13 #39	C	GAGGTGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGATCACCAC-----	39
SP13 #38	C	GAGGAGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGATCGCCAC-----	39
SP13 #137	C	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGATCACCAC-----	39
SP13 #37	-	GGGCGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGATCACCAC-----	38
SP13 #79	C	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGATTACCCAC-----	39
SP13 #105	C	GAGGCGGGTGGGTGGG TTGAATATGCTGACTACCAC-----	39
SP13 #138	-	GGTGGGCGGGTGGG TTGAATATGCTGATTACCCAC-----	37
		** ** * ***** ** * *****	
		-Konsensus-Sequenz (GAGGYGGGTGGGTGGG) -	

Abb. 5.20: Sequenzalignment der Kernregion ausgewählter Aptamerklone aus SELEX SL1 und SP13

Durchgeführt wurden die Alignments mit Hilfe des Programmes Clustal W. Es wurden nur die Kernregionen der Aptamere ohne die definierten Primerbindungsbereiche dargestellt. **Grau** markierte Nukleotide wurden in mehreren oder allen hier betrachteten Aptameren gefunden. **Fett** gedruckte Buchstaben markieren die Nukleotide des Konsensusbereiches der Gruppen I und II des SELEX SL1.

Diese Ähnlichkeit erstaunte, da völlig verschiedene Targets in den beiden *in vitro* Selektionen eingesetzt worden waren. Trotzdem waren die Sequenzen der Kernregionen in einem Bereich von ~36 Nukleotiden nahezu identisch. Auch die identifizierte Konsensus-Sequenz (**GAGGYGGGTGGGTGGG**) der Gruppen I und II des SELEX SL1 wurde in den Aptameren der Gruppe II des SELEX SP13 gefunden. Um weitere Informationen zu diesem Phänomen zu sammeln, wurden alle folgenden Versuche nicht nur mit Aptameren aus SELEX SL1 durchgeführt, sondern zusätzlich und vergleichend auch mit dem Oligonukleotid #137 aus SELEX SP13, als repräsentativem Vertreter der entsprechenden strukturähnlichen Aptamere.

5.2.2.2 Analyse der Sekundärstrukturen

Die hypothetische Sekundärstruktur der Aptamere für Ethanolamin wurde mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms mfold (Version 3.1) (siehe Kap. 4.7.2) berechnet. Dieses Programm führt die Strukturanalyse nach einer Energie-Minimierungs-Methode nach Michael Zuker aus. Erkannt werden Stems (doppelsträngige Bereiche), Loops (Schleifenbildung von einzelsträngigen Bereichen, wie Haarnadelschleifen oder interne Schleifen) und Bulbs (kleine, einzelsträngige Ausbuchtungen in doppelsträngigen Bereichen). Abbildung 5.21 zeigt die errechneten Strukturvarianten für die Aptamerklone der Sequenzgruppen I.1-3 und II.1-3. Gezeigt werden die energetisch günstigsten Varianten bei Standardbedingungen (Bindungs-/Faltungstemperatur: 21°C; Ionenstärke des Puffers (BB+): $[Na^+]$ 100mM / $[Mg^{2+}]$ 2mM). Darüber hinaus gibt es Abwandlungen dieser Strukturen, die rein rechnerisch energetisch ungünstiger sind. Welche der möglichen Sekundärstrukturen die Aptamere bei ihrer Bindung an das Zielmolekül in der Realität einnehmen, lässt sich mit dieser Strukturanalysenmethode nicht gesichert bestimmen. Für die Gruppe II.1 und II.3 sind daher noch zwei weitere energetisch weniger günstige Strukturvarianten angegeben.

Bei dem Vergleich der Sekundärstrukturen der Gruppe I ist zu beobachten, dass sie beinahe identisch sind. Die Struktur der Gruppe I.1 unterscheidet sich von der der Gruppen I.2 und I.3 nur dahingehend, dass die kleine Stem-Anordnung der Gruppe I.1 aus 3 Basenpaaren besteht (58'-60' und 64'-66') und die von Gruppe I.2/3 aus nur 2 Basenpaaren (58'-59' und 65'-66'), da hier an Position 60' statt Thymin ein Guanin vorhanden ist. Eine weitere Basenvarianz an Position 57' der Gruppe I.3 (Thymin → Cytosin), hat keinen Einfluss auf die Struktur.

Eine Gegenüberstellung der Strukturvarianten der Gruppe II zeigt ebenfalls wiederkehrende Formationen innerhalb der Gruppe. Die errechnete, energetisch günstigste Variante der Gruppe II.1 Klone unterscheidet sich jedoch offensichtlich von denen der anderen beiden Gruppen. Die Struktur wird jedoch auch für die Gruppe-II.3-Klone als zweitgünstigste Variante errechnet. Die energetisch zweitgünstige Variante der Gruppe II.1 entspricht den Strukturen der anderen Gruppen. Weder die Besetzung mit Cytosin oder Thymin an Position 23' der Gruppe-II.2-Klone, noch die Besetzung mit Guanin oder Adenin an Position 48' haben strukturelle Auswirkungen.

Beim Vergleich der Strukturen beider Gruppen untereinander ist zu erkennen, dass sich auch hier die Strukturen grundsätzlich ähneln. Die Primerregion AP10 bildet in allen Fällen zunächst einen Einzelstrangbereich aus und ist dann in eine Stem-Konstruktion einbezogen. Der Primerbindungsbereich AP20 ist ebenfalls an einer Stem-Loop-Konstruktion beteiligt (Klone der Gruppe I), oder er bildet die gesamte Stem-Loop-Konstruktion (Klone der Gruppe II). Die Konsensus-Sequenz (Rot) liegt in den meisten Fällen bei beiden Gruppen in einem Einzelstrangbereich (Loop). Nur in der Hauptvariante der Gruppe II.1, bzw. Nebenvariante Gruppe II.3 liegt die Konsensus-Sequenz mit den ersten vier Basen innerhalb einer Stem-Konstruktion.

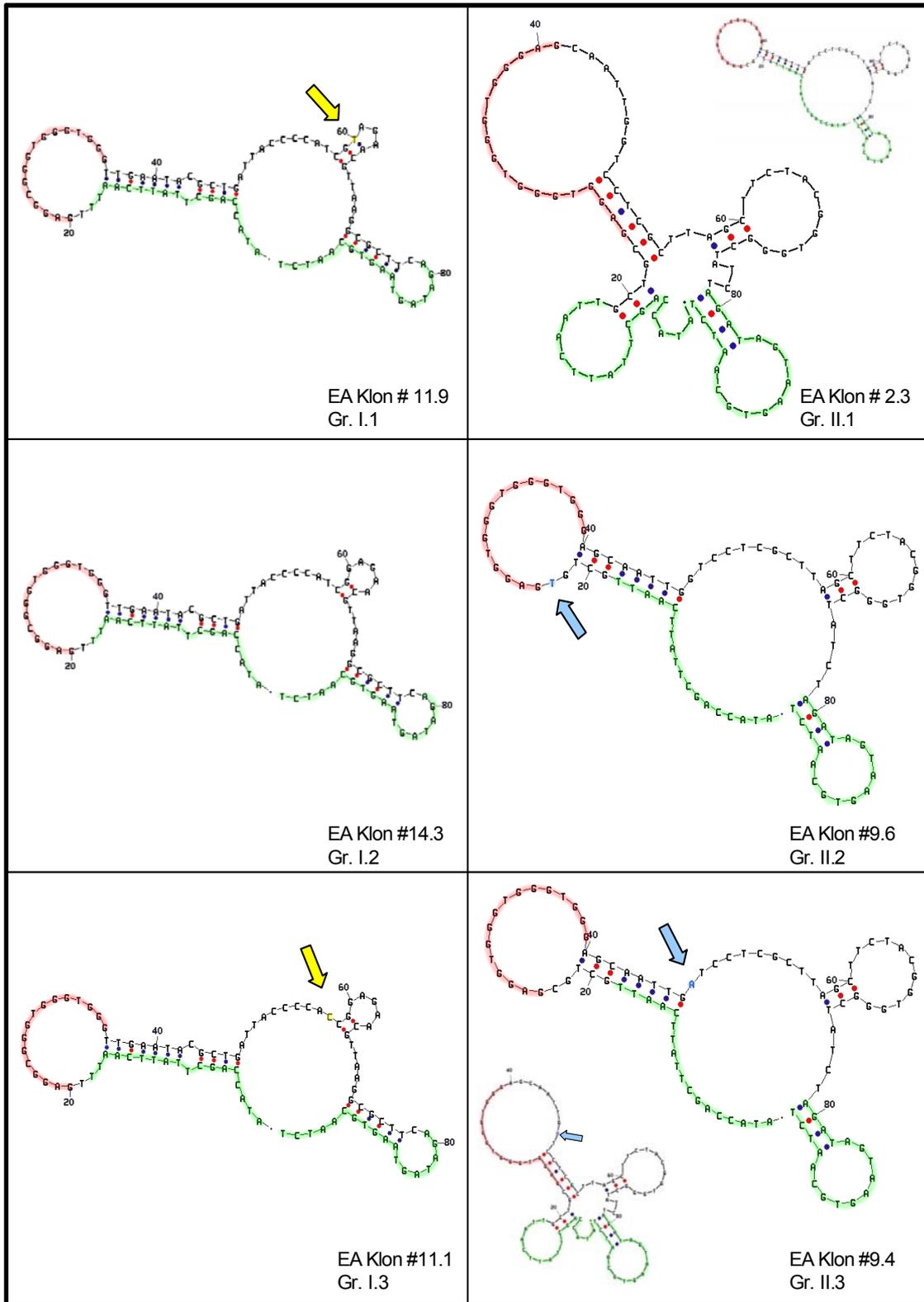


Abb. 5.21: **Hypothetische Sekundärstrukturen ausgewählter Aptamerklone**

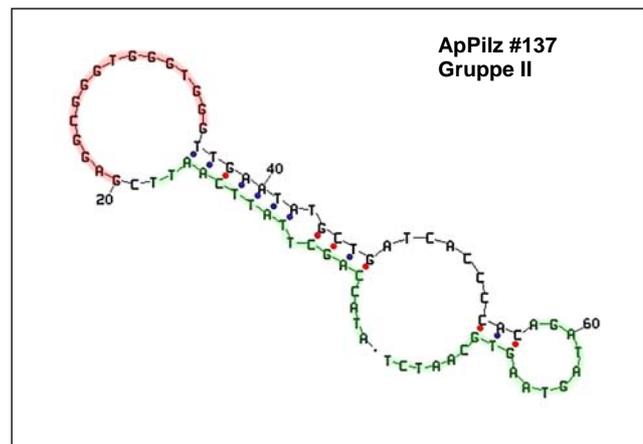
Dargestellt sind die hypothetischen Sekundärstrukturen der Sequenzgruppen I und II, errechnet durch das Programm mfold (Zuker, 2003). Gezeigt sind die energetisch günstigsten Strukturvarianten (großes Bild). In zwei Fällen sind auch die energetisch zweitgünstigsten Varianten angegeben (kleines Bild).

Die Pfeile deuten auf variable Basen einer Gruppe. **Rot** markierte Bereiche entsprechen der Konsensus-Sequenz. **Grüne** Bereiche sind Primerregionen.

Aptamer #137 aus SELEX SP13 ähnelt in seiner berechneten Sekundärstruktur den Klonen der Gruppe I des SELEX SL1 (siehe Abb. 5.22). Auch hier bildet die Primerregion AP10 zunächst einen Einzelstrangbereich und ist dann an einer Stem-Konstruktion beteiligt. Der Konsensusbereich ist ebenfalls in einem Loop angeordnet. Auch der Primerbindungsbereich AP20 ist in der gleichen Weise, wie der der Klone der Gruppe I, in eine Stem-Loop-Konstruktion einbezogen. Aufgrund seiner geringeren Größe (76 nt) fehlt bei Aptamer #137 der kleinere Stem-Loop und der Einzelstrangbereich in „der Mitte“ der Struktur ist kleiner.

Abb. 5.22: **Hypothetische Sekundärstruktur des Aptamers #137 aus SELEX SP13**

Gezeigt ist die energetisch günstigste Strukturvariante.
 Rot markierte Bereiche entsprechen der Konsensus-Sequenz. Grüne Bereiche sind Primerregionen.



5.2.3 Bindungsstudien mit individuellen Aptameren

Nach der Sequenzanalyse der 37 Klone aus SELEX SL1 und deren Einteilung in Sequenzgruppen wurden zur näheren Untersuchung der Bindungseigenschaften repräsentative Klone ausgewählt. In verschiedenen Bindungsversuchen, die entsprechend den SELEX-Bedingungen mit Ethanolamin-modifizierten Beads durchgeführt wurden, konnten detaillierte Informationen zur Affinität und Spezifität der individuellen Aptamerklone gewonnen werden. Dazu gehörten qualitativ vergleichende Bindungsversuche, die Aufnahme von Sättigungskurven ausgewählter Aptamere zur Bestimmung der Dissoziationskonstante, sowie Versuche zur Bindung der Aptamere an frei in Lösung vorliegendes Ethanolamin und strukturell verwandte Substanzen.

5.2.3.1 Bindungseffizienz der individuellen Aptamerklone

Die ersten Bindungsversuche fanden mit je einem Aptamerklon pro Sequenzgruppe, bzw. Untergruppe statt, um festzustellen, wie gut die verschiedenen Aptamere bei konstanten Versuchsbedingungen das Target Ethanolamin erkennen und binden. Die Versuche wurden wie unter Kapitel 4.8.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden je Aptamer ca. 15 pmol Fluorescein-markierter ssDNA und 1×10^7 Ethanolamin-Tosyl-Beads eingesetzt. Die Aptamer-ssDNA wurde an das auf die Beads immobilisierte Ethanolamin gebunden, nach Waschen dieses Komplexes wurden die gebundenen Aptamere durch Hitze eluiert und anschließend mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die gemessene Menge an eluierter, fluoreszenzmarkierter ssDNA der Menge an gebundener ssDNA entspricht. Tabelle 5.12 und Abbildung 5.23 fassen die Ergebnisse dieser Bindungsversuche zusammen. Aufgelistet sind die eingesetzten Mengen an ssDNA

5.2 Aptamere für Ethanolamin

[pmol], die Menge an ssDNA im Eluat [pmol]. Bezogen sind diese Werte jeweils auf 1×10^7 eingesetzte Beads. Zudem wurde noch die Menge an gebundenen Aptamer-molekülen pro Bead errechnet [Moleküle/Bead]. Als Referenz- und Negativprobe wurde die Ausgangsbibliothek BANK-A mitgeführt.

Tab. 5.12: **Übersicht über die Bindungsversuche aller Einzelklone mit Ethanolamin-Beads**

Für die Bindungsversuche wurden Ethanolamin-Beads mit dem jeweiligen Aptamer inkubiert. Nach einer Waschung wurde die Bead-gebundene ssDNA mittels Hitzeelution von den Beads eluiert und die Menge in einer Fluoreszenzbestimmung ermittelt. Die eingesetzte Bead-Zahl betrug jeweils $\sim 10^7$ Beads. Die eingesetzte und eluierte Menge an ssDNA wurden aufgelistet, ebenso die Anzahl eluierter Moleküle pro Bead (Molekulargewicht für ein Oligonukleotid mit 96 Nukleotiden = 31392 g/mol [327 g/mol pro Nukleotid]; 1 mol entsprechen $\sim 6,02205 \times 10^{23}$ Molekülen [Avogadro-Konstante])

Bindungsversuche individueller Aptamere mit Ethanolamin-Beads							
Gruppe	Aptamer	Ausgangs-ssDNA [pmol]		Eluat [pmol]		Moleküle / Bead	
I	#14.3	15,6	± 2,4	0,95	± 0,19	57163	± 11383
I	#11.9	17,8	± 6,4	0,88	± 0,20	52900	± 12110
I	#11.1	15,3	± 0,1	0,84	± 0,12	50571	± 7052
I	#5.7	11,5	± 1,1	0,93	± 0,12	56251	± 7142
I	#2.7	14,7	± 0,8	0,81	± 0,06	48484	± 3827
I	#2.2	12,7	± 0,1	0,83	± 0,03	49742	± 1771
I	#11.8	15,4	± 0,4	0,94	± 0,02	56524	± 1082
I	#9.9	10,4	± 1,2	0,79	± 0,12	47471	± 7318
II	#9.4	13,4	± 0,5	1,63	± 0,26	97880	± 15442
II	#2.3	16,9	± 0,7	2,14	± 0,12	128725	± 7286
II	#9.6	12,6	± 0,8	1,92	± 0,12	115413	± 7331
II	#9.10	14,9	± 0,6	3,09	± 0,11	186137	± 6455
II	#5.1	13,3	± 0,1	2,29	± 0,02	137832	± 1133
II	#2.9	16,4	± 0,2	2,23	± 0,00	134154	± 255
II	#14.1	16,3	± 0,5	1,98	± 0,02	119382	± 1252
II	#9.1	16,3	± 1,5	2,09	± 0,06	125693	± 3415
II	#14.6	15,6	± 0,3	1,97	± 0,18	118870	± 10901
III	#5.10	13,3	± 0,4	0,00	± 0,00	192	± 283
IV	#14.5	13,9	± 0,7	0,82	± 0,03	49103	± 2002
V	#14.8	12,1	± 0,4	0,09	± 0,02	5461	± 906
VI	#14.4	10,5	± 0,2	0,01	± 0,00	449	± 16
VII	#11.5	16,4	± 1,1	0,18	± 0,00	10586	± 154
	BANK-A	16,6	± 1,8	0,15	± 0,03	9308	± 1818

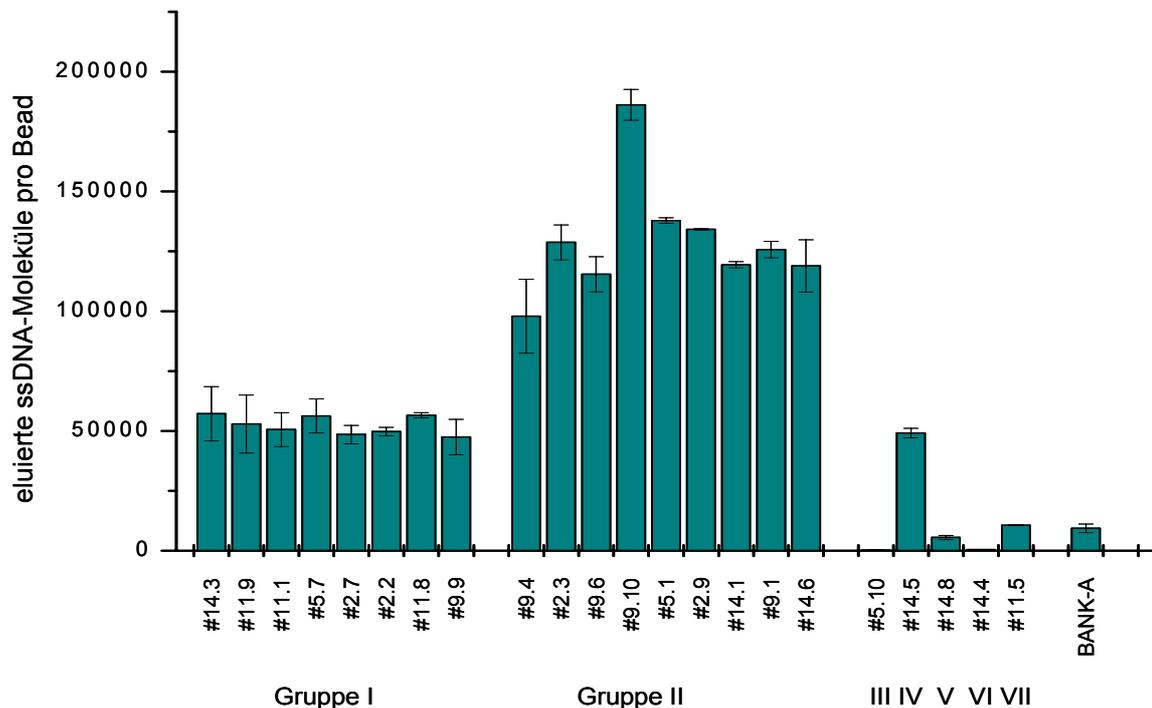


Abb. 5.23: **Übersicht über die Bindungsversuche aller Einzelklone mit Ethanolamin-Beads**

Bindungsversuche mit Einzelklon-ssDNA an je 10^7 Ethanolamin-Beads, dargestellt als eluierte ssDNA-Moleküle pro Bead.

Die Bindungsversuche haben gezeigt, dass alle Einzelklone der Gruppen I, II und IV eine Bindungsreaktion mit Ethanolamin (immobilisiert an Tosyl-Beads) eingingen. Dabei wurde deutlich, dass erheblich größere Mengen der Aptamere der Gruppe II an den Ethanolamin-Beads gebunden hatten, als Aptamere der Gruppe I oder IV. Auch innerhalb der einzelnen Gruppen zeigten sich Unterschiede in der Menge an eluierter ssDNA. Bei den Klonen der Gruppen III, V, VI und VII wurde keine bzw. nur eine geringfügige Bindung an die Target-Beads gefunden.

Die im Vorhinein aufgestellte Vermutung, dass im SELEX-Prozess SL1, Aptamere für Ethanolamin erzeugt worden waren, wurde mit diesen Versuchen bestätigt. Mehr als 89 % der untersuchten individuellen Klone des angereicherten Oligonukleotidpools zeigten eine Bindung an Ethanolamin-Beads. Der wesentliche Anteil der bindenden Aptamere lässt sich einer der Hauptgruppen I oder II zuordnen, welche ein identisches Konsensus-Motiv enthalten.

5.2.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Auf Grund der Ergebnisse der Bindungsversuche (siehe Kap. 5.2.3.1) sollten für repräsentative Vertreter der Sequenzfamilien I und II die Dissoziationskonstanten K_D (entspricht Affinitätskonstanten) bestimmt werden. Dazu wurden Sättigungskurven der Aptamere #14.3 und #11.9 der Gruppe I, sowie der Aptamere #2.3, #9.6, #9.4 und #9.10 der Gruppe II erstellt. Ausgewählt wurden diese charakteristischen Vertreter der einzelnen Untergruppen auf Grund ihres hohen Bindungsvermögens (ermittelt in den Bindungsversuchen, siehe Kap. 5.2.3.1). Zusätzlich wurde die Sättigungskurve des Aptamers ApPilz #137 aus SELEX SP13 aufgenommen. Mit der Aufnahme von Sättigungskurven kann sowohl die Affinität (K_D) der einzelnen Aptamere für Ethanolamin-Beads, als auch die Zahl

der möglichen Bindungsstellen unter den angewandten Bedingungen (B_{\max}) ermittelt werden. Die maximale Anzahl der möglichen Bindungsstellen im Versuch (B_{\max}) wird dabei einerseits bestimmt durch die maximale Bindungskapazität der Ethanolamin-Beads, andererseits durch die Bindungseigenschaften des Aptamers. Um entsprechende Sättigungskurven zu erhalten, wurden mehrere Bindungsversuche mit konstanter Beadzahl (10^7) durchgeführt, wobei eine kontinuierlich ansteigende Konzentration an Aptamer-DNA (0 nM bis 70 nM) zum Einsatz kam (siehe Kap. 4.8.1). Die Menge an gebundener ssDNA wurde nach der Hitzeelution in Bindungspuffer über die direkte Fluoreszenzmessung bestimmt. Die graphische Auswertung der erhaltenen Daten zeigt die nachfolgende Abbildung (siehe Abb. 5.24).

Die erhaltenen Kurven zeigen eine hyperbolische Beziehung zwischen der ansteigenden Menge an eingesetzter und eluierter ssDNA, die sich mit dem Modell der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten vergleichen lassen. Bei hohem Aptamer-Einsatz (ab ~ 50 nM) kam es zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der Ausbeute an eluierter ssDNA. Die Kurven flachten in diesem Bereich ab, da sich die Menge gebundener ssDNA langsam der maximalen Bindungskapazität der Ethanolamin-Beads im Versuchsansatz und damit einer Sättigung näherte.

Für die Berechnung der beiden Parameter Bindungsaffinität (K_D) und Anzahl der Bindungsstellen wurden folgende Datenanalysemethoden verwendet (siehe Kap. 4.8.1):

- nichtlineare Regressionsanalyse nach Michaelis/Menten und
- Scatchard-Plot-Analyse.

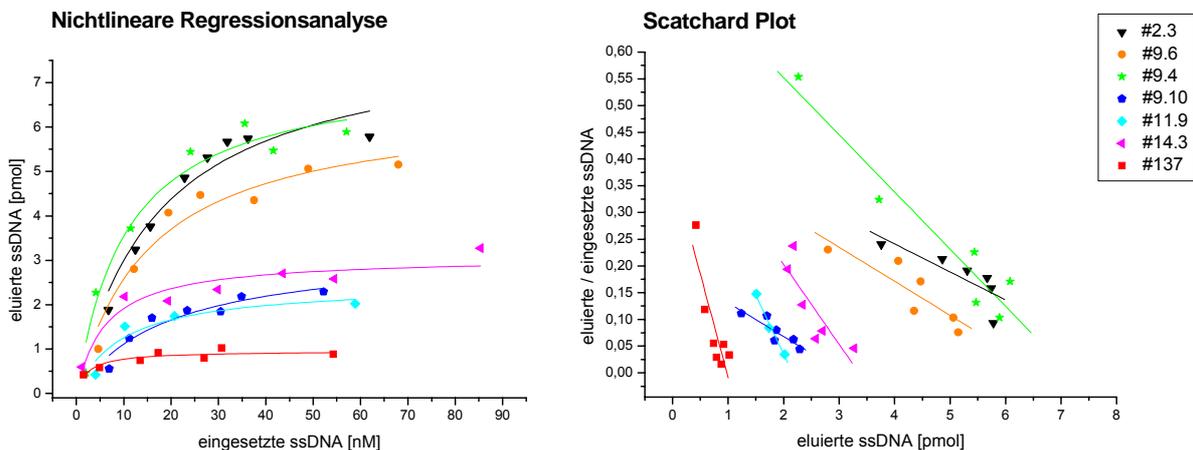
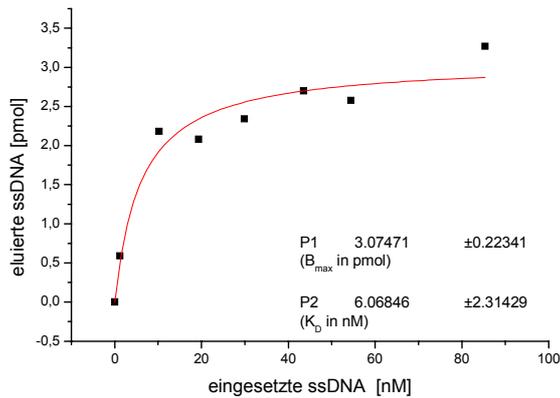


Abb. 5.25: Auswertung der aufgenommenen Sättigungskurven

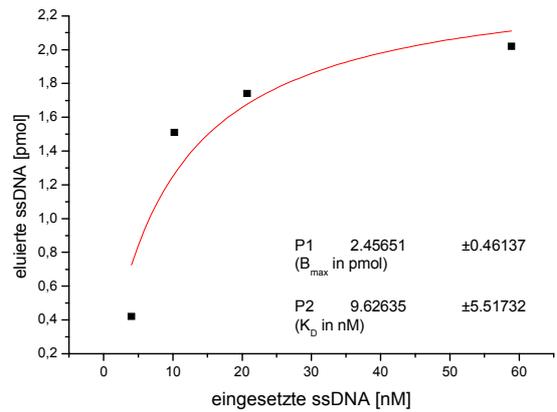
Dargestellt sind die Sättigungskurven ausgewählter Aptamere aus SELEX SL1 und für einen Aptamerklon aus SELEX SP13 (#137). Kontinuierlich ansteigende Mengen an Aptamer-DNA (eingesetzte ssDNA) wurden mit je 10^7 Ethanolamin-Beads inkubiert. Die gebundene ssDNA wurde mit Hitze wieder von den Beads eluiert und die Menge über direkte Fluoreszenzmessung bestimmt (eluierte ssDNA).

Die Kurven wurden sowohl durch nichtlineare Regressionsanalyse, als auch mittels Scatchard-Plot der Sättigungskurven ausgewertet. Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstante (K_D) und die maximale Anzahl der Bindungsstellen im Versuch (B_{\max}) sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

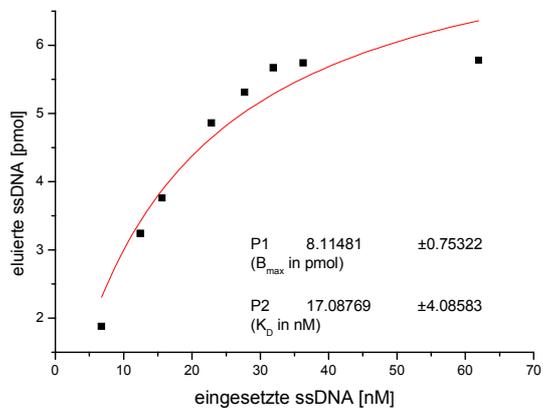
Aptamer #14.3



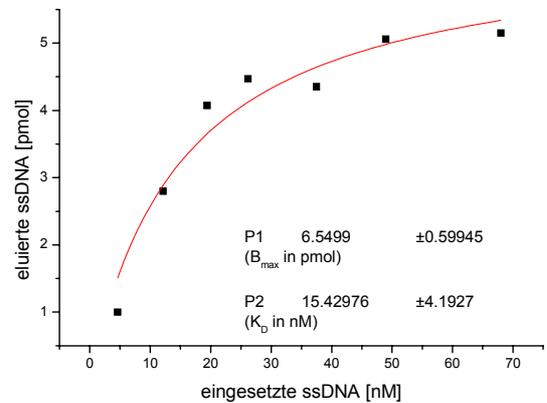
Aptamer #11.9



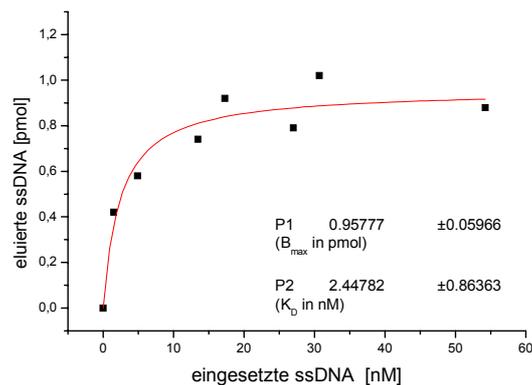
Aptamer #2.3



Aptamer #9.6



Aptamer #137



Aptamer #9.4

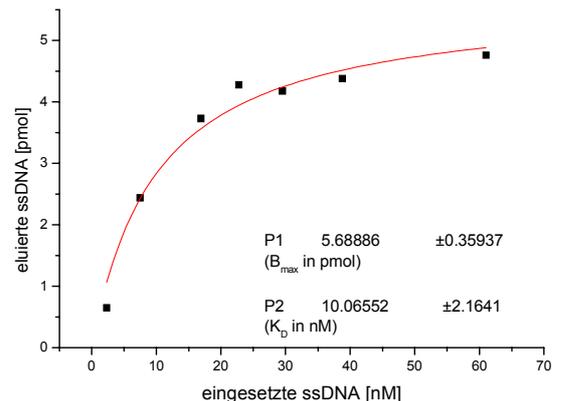


Abb. 5.24: Nichtlineare Regressionsanalyse der aufgenommenen Sättigungskurven

Dargestellt sind die Sättigungskurven ausgewählter Aptamere aus SELEX SL1 und für einen Aptamerklon aus SELEX SP13 (#137). Kontinuierlich ansteigende Mengen an Aptamer-DNA (eingesetzte ssDNA) wurden mit je 10^7 Ethanolamin-Beads inkubiert. Nach einer Hitzeelution der vorher gebundenen ssDNA wurde deren Menge über direkte Fluoreszenzmessung bestimmt (eluierte ssDNA). Die Sättigungskurven lassen sich mit einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten vergleichen. Die Affinitätskonstanten K_D [nM] und die maximale Anzahl der möglichen Bindungsstellen im Versuch B_{\max} [pmol] wurden hieraus ermittelt.

Tab. 5.13: Überblick über die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten (K_D) und die maximale Anzahl der Bindungsstellen im Versuch (B_{max})

Aptamer	K_D [nM]		B_{max} [pmol]	
	nichtlineare Regressionsanalyse	Scatchard-Plot	nichtlineare Regressionsanalyse	Scatchard-Plot
#14.3 (Gruppe I)	6,2 ± 2,9	6,7 ± 3,0	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,3
#11.9 (Gruppe I)	9,6 ± 5,5	4,5 ± 0,7	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,5
#9.4 (Gruppe II)	10,1 ± 2,5	9,3 ± 1,6	5,7 ± 0,4	7,2 ± 2,1
#9.6 (Gruppe II)	15,4 ± 3,4	15,7 ± 4,7	6,5 ± 0,5	6,7 ± 0,9
#2.3 (Gruppe II)	17,1 ± 3,2	19,0 ± 6,5	8,1 ± 0,6	8,6 ± 1,9
#9.10 (Gruppe II)	19,1 ± 7,3	15,8 ± 5,7	3,2 ± 0,7	3,1 ± 0,4
#137 (aus SP13)	2,5 ± 0,9	2,6 ± 0,9	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Tabelle 5.13 zeigt die ermittelten K_D -Werte als Maß für die Bindungsaffinität und die B_{max} -Werte, die die maximale Zahl an Bindungsstellen in einem Versuch bei dem Einsatz von 1×10^7 Ethanolamin-Beads angibt. Mit Ausnahme des ermittelten K_D -Wertes für das Aptamer #11.9 zeigten die zum einen aus der nichtlinearen Regressionsanalyse und zum anderen durch einen Scatchard-Plot bestimmten Werte eine gute Übereinstimmung. Auf diese Weise konnten Dissoziationskonstanten der individuellen Aptamere von 2,5 nM bis 19,0 nM für an Magnetic Beads immobilisiertes Ethanolamin unter den angewandten Versuchsbedingungen ermittelt werden. Die niedrigsten Dissoziationskonstanten der Aptamere des SELEX SL1 konnten für das Aptamer #14.3 der Gruppe I (~6 nM) und #9.4 der Gruppe II (~10 nM) ermittelt werden. Das Aptamer #137 aus SELEX SP13 weist einen noch niedrigeren K_D -Wert von ~2,5 nM auf.

Die errechneten B_{max} -Werte variierten von 1,0 pmol bis 8,6 pmol pro 10^7 Ethanolamin-Beads (entspricht $\sim 6 \times 10^4$ bis $\sim 5 \times 10^5$ Molekülen pro Bead). Hierbei ist zu beachten, dass in Vergleichsversuchen festgestellt wurde, dass die maximale Anzahl der Bindungsstellen für ein individuelles Aptamer innerhalb mehrerer Versuche durchaus schwanken konnten, wenn unterschiedliche Bead-Chargen zur Ethanolamin-Immobilisierung genutzt wurden.

5.2.3.3 Affinitätselution zur Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die Bestimmung der Bindungseffizienz und der Affinitätskonstanten war mit immobilisiertem Target (Ethanolamin gebunden an Magnetic Beads) durchgeführt worden. Mit weiteren Versuchen sollte geklärt werden, welche Spezifität die selektierten Aptamere für das Target Ethanolamin besitzen und welche möglichen Target-Erkennungsstrukturen der Bindung zu Grunde liegen. In diesem Zusammenhang sollte zunächst festgestellt werden, ob die Aptamere freies, nicht immobilisiertes Ethanolamin binden können und welche

Kreuzreaktivitäten zu anderen, struktur- und funktionsverwandten Substanzen bestehen. Dazu wurden Affinitätselutions-Experimente durchgeführt, bei denen die Aptamere an Ethanolamin-gesättigten Beads gebunden und danach mittels der in ungebundener Form in Lösung vorliegenden zu untersuchenden Substanzen eluiert wurden. Die Elution durch die jeweilige freie Substanz setzt eine entsprechende Affinität des Aptamers für diese Substanz voraus. Die genaue Versuchsdurchführung findet sich in Kapitel 4.8.2. In Tabelle 5.14 sind die verwendeten Chemikalien (freie Reagenzien für Affinitätselution) und deren Eigenfluoreszenzwerte aufgelistet. Die Eigenfluoreszenzwerte wurden bestimmt, da sie einer Verfälschung der Messergebnisse führen könnten. Im Falle von Lysin, bei dem eine hohe Eigenfluoreszenz vorliegt, wurde der entsprechende Wert bei der Auswertung wieder abgezogen. Warum diese Besonderheit auftrat, ist nicht erklärbar. Eigentlich besitzt Lysin keine Strukturen, die dafür bekannt sind zu fluoreszieren. Hussmann (*Hussmann, 1968*) findet zwar als Nachreaktion bei Röntgenbestrahlung von wässrigen Lysinlösungen eine zunehmende Fluoreszenz durch Bildung von heterozyklischen Verbindungen, aber es ist nicht bekannt, ob solche Effekte auch bei Lagerung unter UV-Einfluss (Tageslicht) auftreten.

Tab. 5.14: **Übersicht der eingesetzten Substanzen für die Affinitätselutions-Versuche, deren Eigenfluoreszenz- und pH-Werte**

Die entsprechenden Reagenzien lagen frei in Lösung in einer Konzentration von 10 mM in Bindungspuffer vor. Die Eigenfluoreszenz wurde analog den Messungen für Fluorescein-markierte ssDNA bestimmt (siehe Kap. 4.3.1).

Name	Eigenfluoreszenz	pH-Wert
Ethanolamin	133 ± 13	8,06
Diethanolamin	163 ± 20	8,16
Triethanolamin	150 ± 25	8,33
4-Amino-1-Butanol	66 ± 17	8,32
4-Amino-1-Hexanol	152 ± 37	8,21
Ethanol	75 ± 10	7,42
Diethylamin	90 ± 17	7,91
Triethylamin	69 ± 3	8,26
2-(Methylamino)-Ethanol	101 ± 19	8,57
2-Phenoxyethylamin	75 ± 13	8,25
Phosphoethanolamin	108 ± 34	5,15
Cytidine 5'-diphosphoethanolamin (Natrium-Salz)	286 ± 41	7,39
Cholin (Chlorid)	154 ± 11	7,13
Serin	188 ± 29	7,20
Glycin	202 ± 31	7,24
β-Alanin	113 ± 13	7,26
Lysin	1399 ± 132	8,07
Arginin	171 ± 21	7,87
Bindungspuffer	130 ± 23	7,35

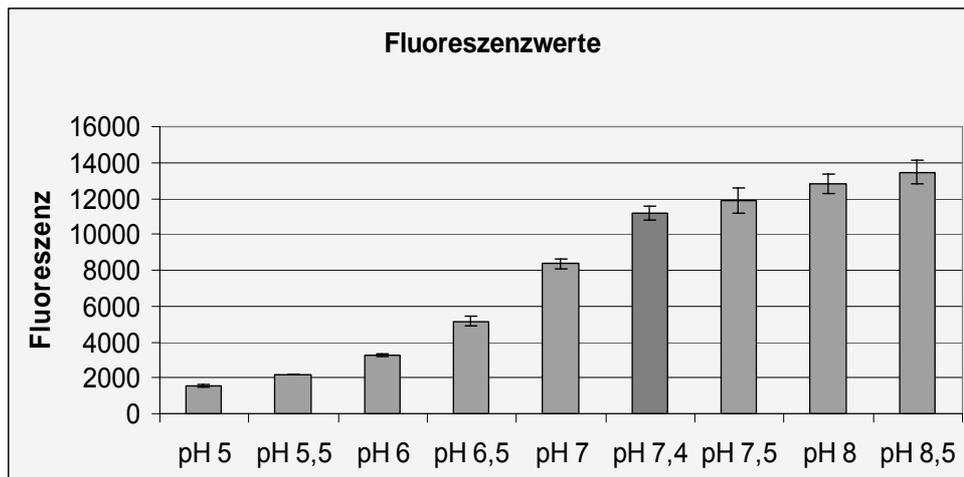


Abb. 5.26: **Fluoreszenzwerte von Fluorescein-markierter ssDNA in Bindungspuffer mit unterschiedlichem pH-Wert**

Gezeigt werden die gemessenen Fluoreszenzwerte von je 5 pmol ssDNA (BANK-A) in je 100 μ L Bindungspuffer. Der pH-Wert des Puffers wurde jeweils vor der Zugabe der Fluorescein-markierten ssDNA entsprechend eingestellt. Der für die Bindungsversuche verwendete Bindungspuffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Messergebnisse zeigen, dass niedrige pH-Werte (5-6) die Fluoreszenz sehr stark beeinflussen. Bei einem pH-Wert von 5 sinkt die Fluoreszenz um ca. 86 % zum Ausgangswert ab. Höhere pH-Werte beeinflussen die Fluoreszenz kaum.

Die zusätzliche Bestimmung des pH-Wertes der in Bindungspuffer gelösten Substanz sollte einen Hinweis darauf geben, ob während der Fluoreszenzmessung eine pH-Wert-Korrektur erfolgen müsste, da der pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf den Fluoreszenz-Messwert besitzt (Abb. 5.26).

Für Phosphoethanolamin wurde daher vor der Messung der pH-Wert der Lösung auf pH 7,3 erhöht, da der Wert (pH 5,15) im sauren und daher stark verfälschenden Bereich lag. Für alle anderen Chemikalien war diese Korrektur nicht notwendig.

Bindung an frei in Lösung vorliegendes Ethanolamin

Auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse (Kap. 5.2.3.1 und 5.2.2.1) wurden für die Affinitätsversuche die Aptamere #14.3 (Gruppe I), #9.4 (Gruppe II) und #137 (aus SELEX SP13) als drei repräsentative Vertreter der selektierten Oligonukleotide ausgewählt. Die Versuche zur Ermittlung der optimalen Elutionszeiten wurden nur mit den Aptameren #14.3 der Gruppe I und #9.4 der Gruppe II durchgeführt.

Zum Nachweis der Bindung an freies Ethanolamin wurden die individuellen Aptamere zunächst mit Ethanolamin-gesättigten Beads zur Bindung gebracht. Anschließend wurden die Beads im Bindungspuffer mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Ethanolamin inkubiert (15 min), so dass die gebundenen Aptamere durch den Überschuss an freien Targetmolekülen (Ethanolamin) in einer Konkurrenzreaktion von den Beads eluiert und an das freie Ethanolamin gebunden wurden. Die Menge an eingesetztem freiem Ethanolamin lag im Bereich zwischen 0 und 5000 nmol / 500 μ L. Wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben, wurden nach der Affinitätselution mit freiem Target eine dreimalige Waschung mit Bindungspuffer und eine anschließende Hitzeelution bei 80 °C durchgeführt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass mit diesen Schritten alle vormals gebundene ssDNA wieder zurückgewonnen wurde. Die ssDNA-Menge der affinitätseluierten Fraktion wurde prozentual zur Gesamtmenge der wiedergefundenen ssDNA ausgewertet. Deutlich wird dabei, dass bei

einer Elution mit reiner Pufferlösung (Bindungspuffer) die Aptamere bereits zu ~15–20 % von dem immobilisierten Ethanolamin abgelöst werden. Darüber hinaus wurde jedoch eine Konzentrationsabhängigkeit der Affinitätselution der Aptamere durch freies Ethanolamin nachgewiesen. Bei einer Konzentration von 5000 nmol / 500 μ L freiem Ethanolamin, was einem hohen Überschuss an freiem Ethanolamin entspricht, fand die Elution ~80–95 % statt, bei einer Konzentration von 1000 nmol / 500 μ L zu ~30–40 %. Nachfolgend wurden deshalb bei allen Affinitätselutions-Versuchen 5 μ mol freies Reagenz in 500 μ L Bindungspuffer eingesetzt. Das entspricht einer Konzentration von 10 mM.

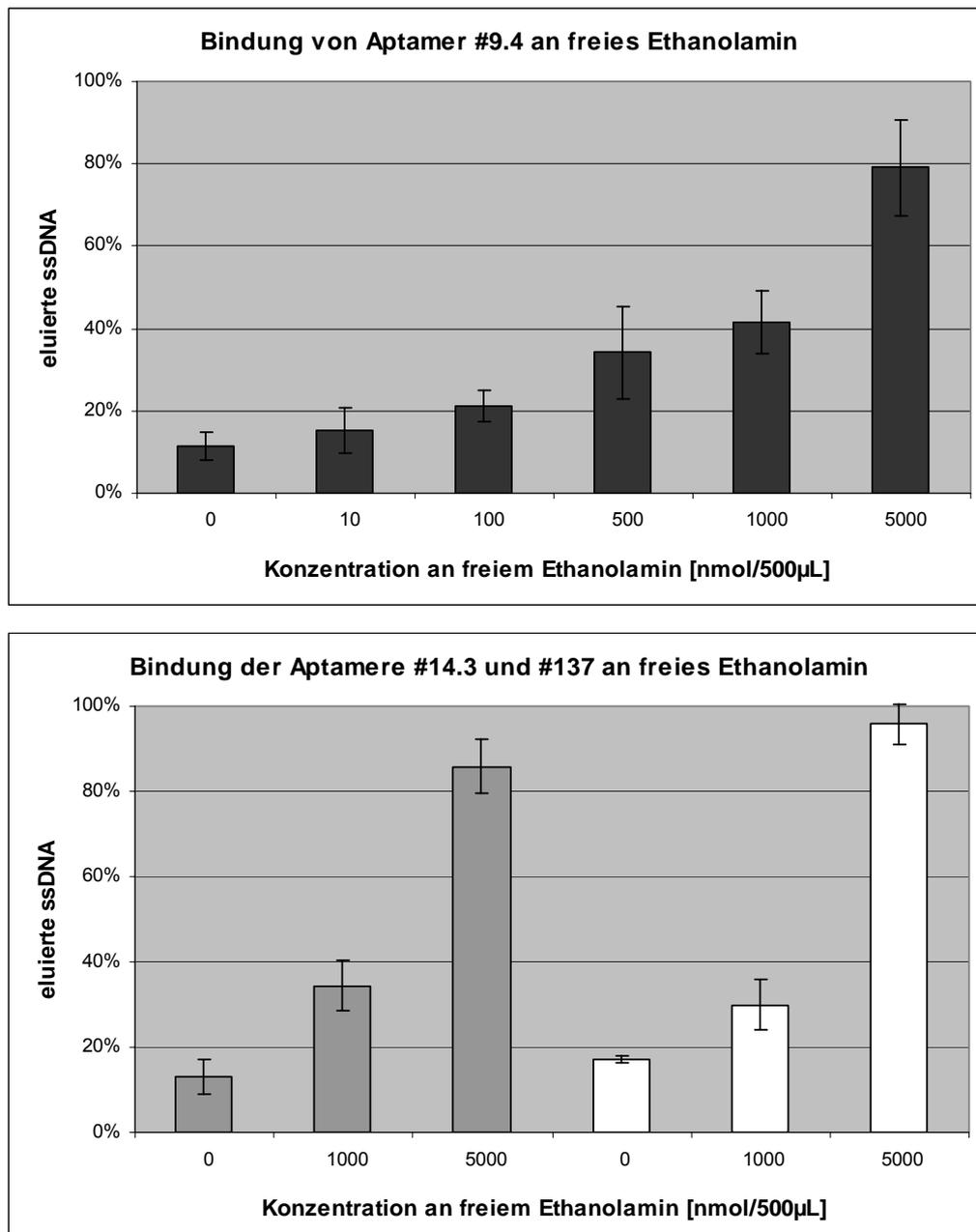


Abb. 5.27: **Affinitätselution mit frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin**

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit unterschiedlichen Konzentrationen an frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin (10-5000 nmol / 500 μ L). Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (**grau** [#14.3], **schwarz** [#9.4] oder **weiß** [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Variation der Elutionszeit

In einem weiteren Versuch sollte der Einfluss der Elutionszeit während der Affinitätselution auf die Menge der eluierten ssDNA ermittelt werden. Dazu wurden die Elutionszeiten variiert. Sie betragen 5, 15, 30 und 60 Minuten.

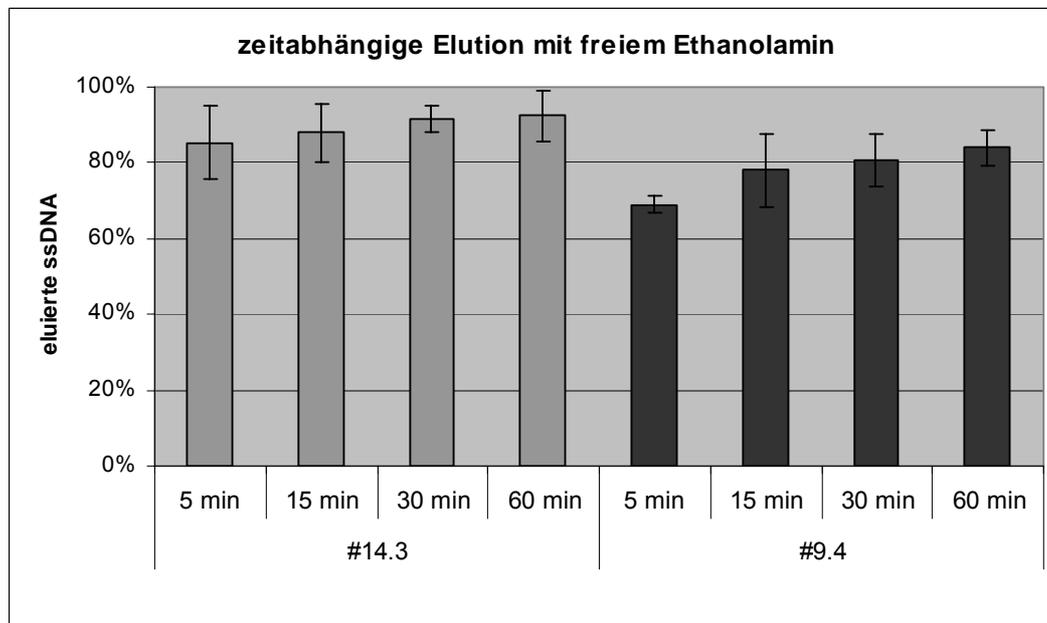


Abb. 5.28: **Affinitätselution mit frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin (EA) bei variiertem Elutionszeit**

Gezeigt sind die Mengen an eluierter ssDNA [%] in Abhängigkeit von der Elutionszeit. Die Aptamere #14.3 und #9.4 wurden zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit 10 mM frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin bei unterschiedlichen Elutionszeiten. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (grau [#14.3] oder schwarz [#9.4]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Eine Verlängerung der Zeit für die Affinitätselution bewirkte eine erhöhte Elution an ssDNA. Bei Aptamer #9.4 stieg der Anteil an eluierter ssDNA von ca. 70 % bei einer Elutionszeit von 5 min auf fast 85 % bei einer Elutionszeit von 60 min. Bei Aptamer #14.3 hatte eine Änderung der Elutionszeit keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil der eluierten ssDNA. Für alle weiteren Untersuchungen wurde eine Elutionszeit von 15 Minuten festgelegt.

Affinität zu Ethanolaminderivaten

Zunächst sollte die Affinität der ausgewählten Aptamere zu Ethanolamin-Derivaten getestet werden. Dafür wurden Affinitätselutions-Versuche mit Di- und Triethanolamin durchgeführt. Die an Ethanolamin-gesättigten Beads gebundenen Aptamere wurden hierzu mit je 5 µmol / 500 µL freiem Reagenz (10 mM) eluiert.

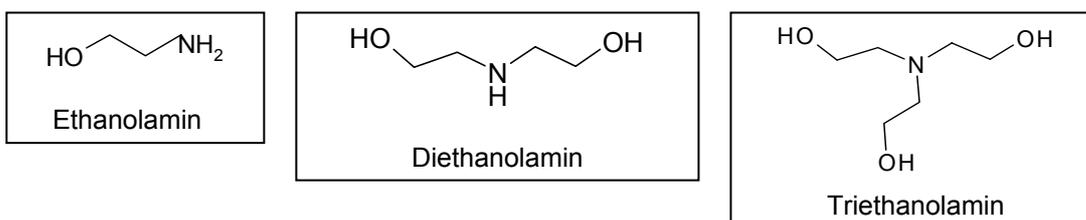


Abb. 5.29: **Strukturformeln von Ethanolamin, Diethanolamin und Triethanolamin**

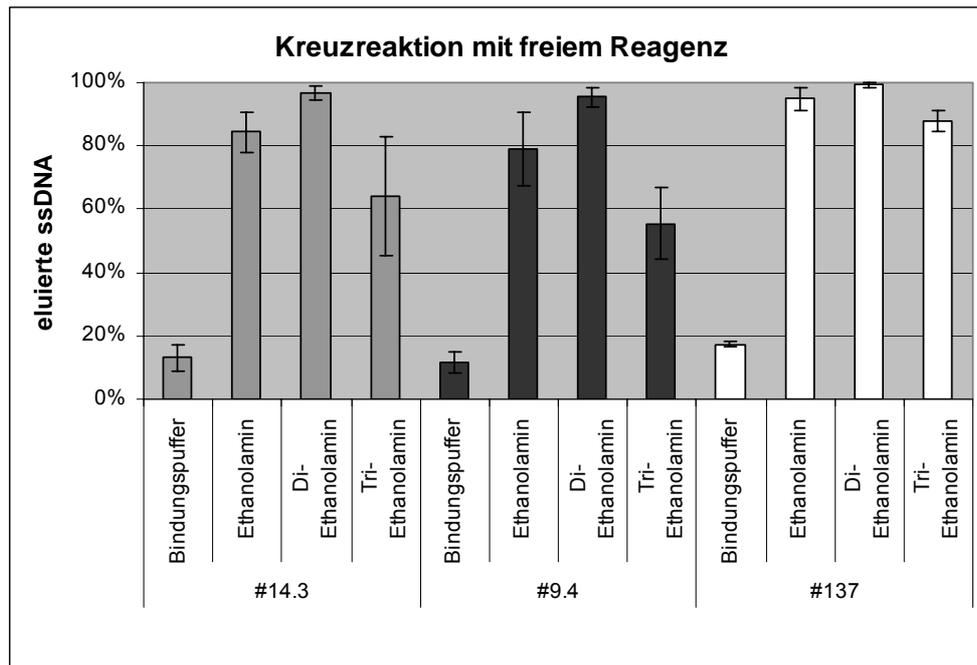


Abb. 5.30: **Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu Ethanolaminderivaten (Diethanolamin, Triethanolamin)**

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Ethanolamin, Diethanolamin oder Triethanolamin. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (**grau** [#14.3], **schwarz** [#9.4] oder **weiß** [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass alle drei Aptamere in der Lage waren, auch an die Ethanolaminderivate Di- und Triethanolamin zu binden. Sie zeigten dabei das gleiche Elutionsmuster, bei dem Diethanolamin sogar in noch höherem Maße (95-100 %) gebunden wurde, als das Selektionstarget Ethanolamin (80-95 %). Triethanolamin wurde etwas schlechter erkannt (55-90 %), als die beiden anderen Derivate. Unterschiede wurden aber in den konkreten Elutionsmengen der drei Aptamere festgestellt. So konnte Aptamer #137 von allen drei Reagenzien in einem höheren Maß wieder eluiert werden, als die Aptamere #14.3 und #9.4. Hier wurden jeweils geringere affinitätseluierte ssDNA-Mengen gefunden. Besonders deutlich fallen die Unterschiede im Bindeverhalten zu den drei Ethanolamin-Derivaten bei Aptamer #9.4 ins Gewicht. Mit Diethanolamin wurde hier 95 % der gebundenen ssDNA-Menge wieder eluiert, mit Ethanolamin ~80 %, während der Anteil bei Triethanolamin nur ~55 % betrug.

Verlängerung des C₂-Grundgerüsts

In nachfolgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob für eine Targeterkennung eine C₂-Grundstruktur des Moleküls zwingend notwendig ist oder ob auch Moleküle mit verlängerten Ketten erkannt werden. Hierzu wurden zwei Moleküle ausgewählt, deren prinzipielle Struktur, der von Ethanolamin gleicht (kettenförmig, gleiche funktionelle Gruppen), im Gegensatz zu Ethanolamin aber ein verlängertes Kohlenstoff-Grundgerüst aufweisen. 4-Amino-1-Butanol enthält vier und 4-Amino-1-Hexanol sechs Kohlenstoffatome.

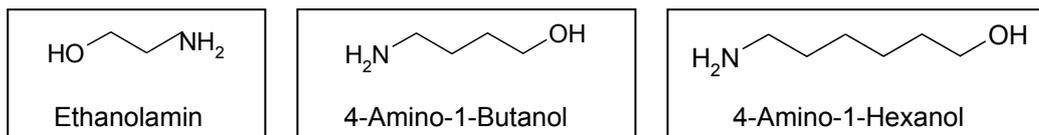


Abb. 5.31: Strukturformeln von Ethanolamin, 4-Amino-1-Butanol und 4-Amino-1-Hexanol

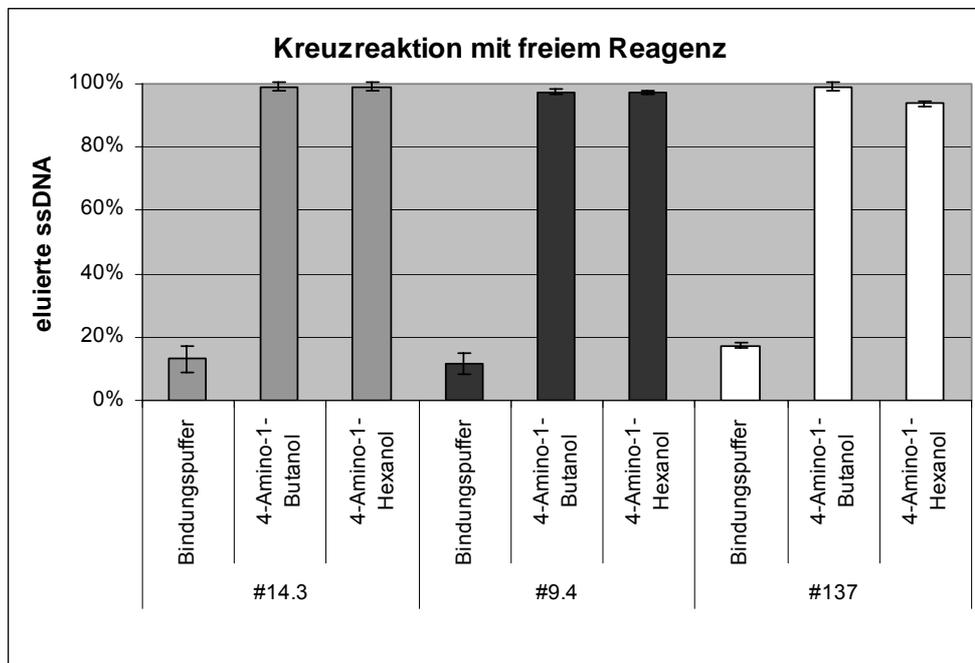


Abb. 5.32: Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 an Moleküle mit verlängerten C-Grundgerüst (4-Amino-1-Butanol, 4-Amino-1-Hexanol)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem 4-Amino-1-Butanol oder 4-Amino-1-Hexanol. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (grau [#14.3], schwarz [#9.4] oder weiß [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aptamere an beide Reagenzien (4-Amino-1-Butanol und 4-Amino-1-Hexanol) sehr gut binden konnten. Die Affinitäts-Elution erfolgte jeweils zu nahezu 100 %. Es war kein Einfluss der C₄- oder C₆-Kette auf die Aptamer-Bindung nachweisbar.

Affinität zu den funktionellen Gruppen

Ethanolamin ist ein einfach strukturiertes Molekül, welches nur zwei funktionelle Gruppen (Hydroxyl- und Aminogruppe) enthält. Im Folgenden sollte herausgefunden werden, ob und welche der beiden Gruppen für eine Bindung zu den selektierten Aptameren notwendig ist. Dafür wurden Versuche mit Substanzen gemacht, denen entweder die Hydroxyl- oder aber die Aminogruppe fehlen, die jeweils andere funktionelle Gruppe aber im Molekül enthalten. Ethanol enthält keine Aminogruppe, besitzt darüber hinaus aber die gleiche chemische Struktur, wie Ethanolamin und wurde daher ausgewählt. Für die Versuche mit Ethanolamin-ähnlichen Substanzen ohne Hydroxylgruppe wurden Diethylamin und Triethylamin herangezogen.

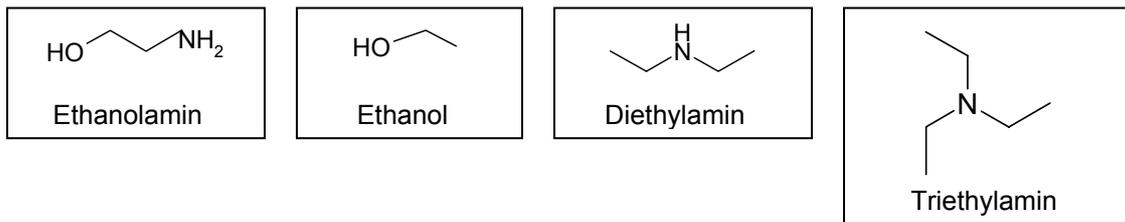


Abb. 5.33: Strukturformeln von Ethanolamin, Ethanol, Diethylamin und Triethylamin

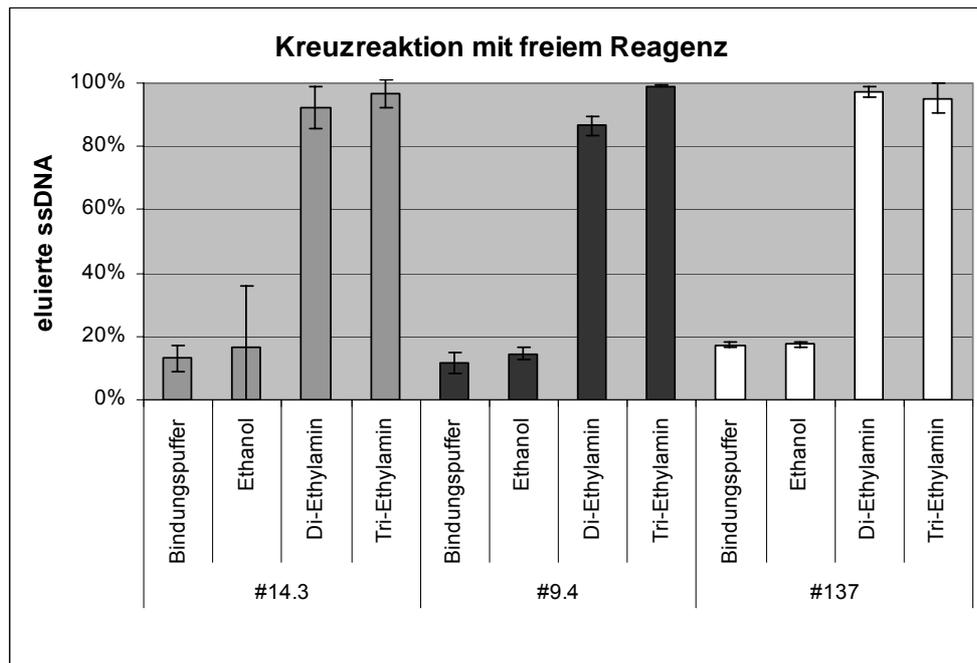


Abb. 5.34: Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 in Abhängigkeit des Vorhandenseins funktioneller Gruppen (Amino-, Hydroxygruppe)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Ethanol (enthält Hydroxyl-, aber keine Aminogruppe), Diethylamin oder Triethylamin (enthalten Amino-, aber keine Hydroxylgruppen). Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (**grau** [#14.3], **schwarz** [#9.4] oder **weiß** [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Es erfolgte bei keinem der drei Aptamere eine Bindung mit Ethanol. Der Vergleich mit den Negativkontrollen (Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz) zeigte, dass die nachgewiesenen ssDNA Mengen in den entsprechenden Fraktionen (~15 %) auf den Auswaschprozess zurückzuführen waren. Di- und Triethylamin wurden sehr gut von den Aptameren gebunden. Mit Triethylamin konnte nahezu die gesamte gebundene ssDNA (95–100 %) wieder eluiert werden. Bei Diethylamin erfolgte eine Elution von >90 % der ssDNA. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Aminogruppe essentiell für die Bindung an das Zielmolekül zu sein scheint, während die Hydroxylgruppe keine Rolle für eine Bindung spielt.

Affinität zu strukturähnlichen Molekülen

Zur weiteren Bestimmung der Spezifität der Aptamere wurden Versuche mit strukturähnlichen Verbindungen durchgeführt. Beide ausgewählten Reagenzien basieren auf der gleichen chemischen Grundstruktur wie Ethanolamin. Methylaminoethanol ist aber über die Aminogruppe mit einem Methylrest verknüpft, während bei Phenoxylethylamin ein Phenolring über das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe an den Aminoethylrest gebunden ist. Mit diesem Versuchsaufbau sollte festgestellt werden, ob die Aptamere Ethanolamin-ähnliche Moleküle erkennen, bei denen die funktionellen Gruppen leicht verändert vorliegen.

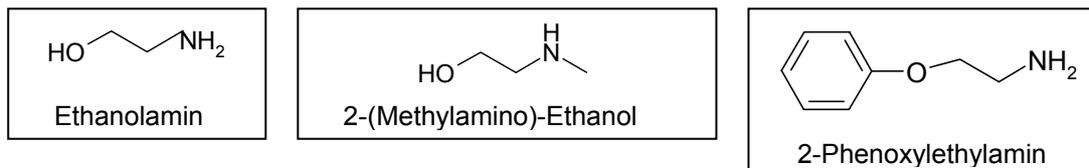


Abb. 5.35: Strukturformeln von Ethanolamin, 2-(Methylamino)-Ethanol und 2-Phenoxylethylamin

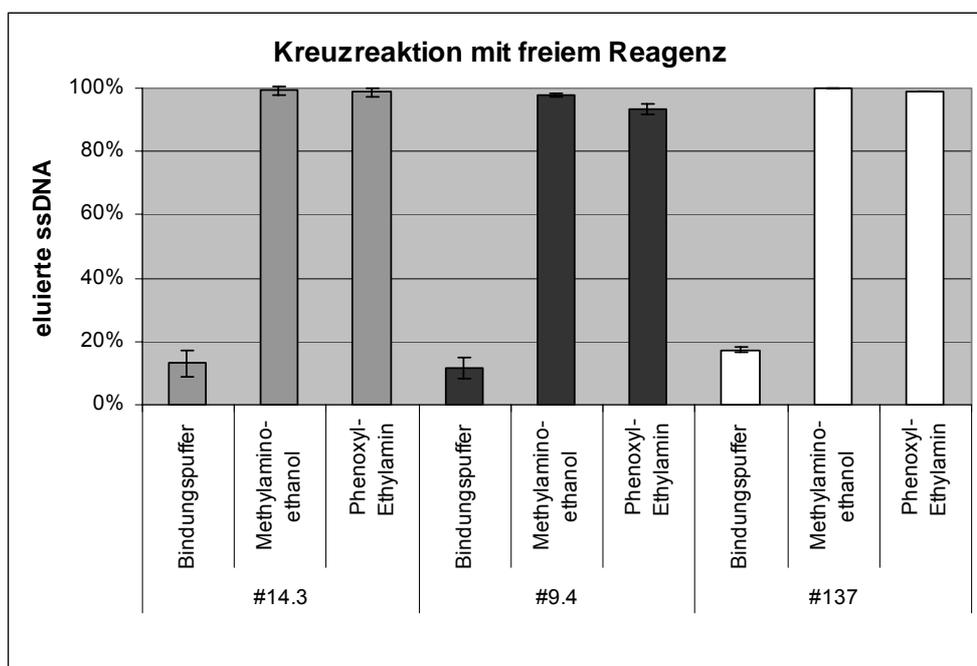


Abb. 5.36: Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu strukturähnlichen Verbindungen (Methylaminoethanol, Phenoxylethylamin)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Methylaminoethanol oder Phenoxylethylamin. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (**grau** [#14.3], **schwarz** [#9.4] oder **weiß** [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Beide Reagenzien wurden durch alle drei Aptamere sehr gut gebunden. Es konnte in allen Fällen eine nahezu 100 %ige Elution erzielt werden. Lediglich bei Aptamer #9.4 war der Anteil der mit Phenoxylethylamin eluierten ssDNA mit ~ 95 % geringfügig niedriger.

Affinität zu phosphorylierten Ethanolaminverbindungen

Große physiologische Bedeutung kommt Ethanolamin in phosphorylierter Form zu (siehe Kap. 3.3.2). Daher sollte das Bindungsvermögen der Aptamere für zwei der wichtigsten phosphorylierten Ethanolaminverbindungen überprüft werden. Phosphoethanolamin besteht aus Ethanolamin, das mit einem Phosphatrest verknüpft ist. Bei CDP-Ethanolamin ist das Ethanolamin mit einem Cytidin-Diphosphat-Nukleotid verbunden.

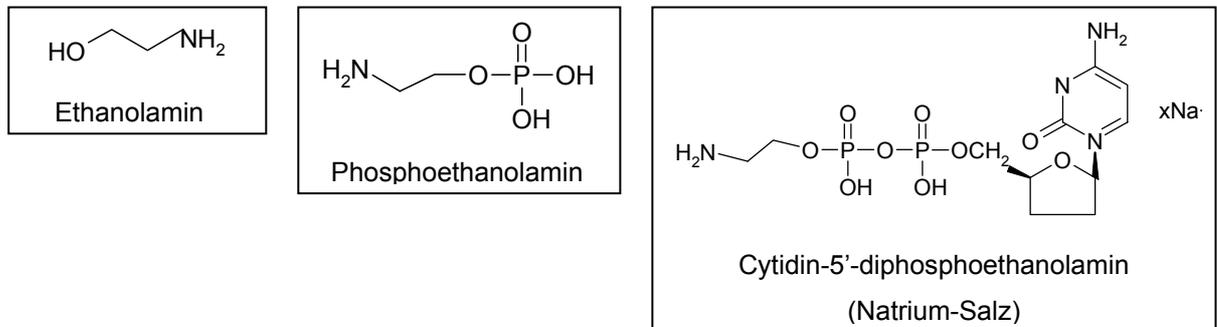


Abb. 5.37: Strukturformeln von Ethanolamin, Phosphoethanolamin und CDP-Ethanolamin

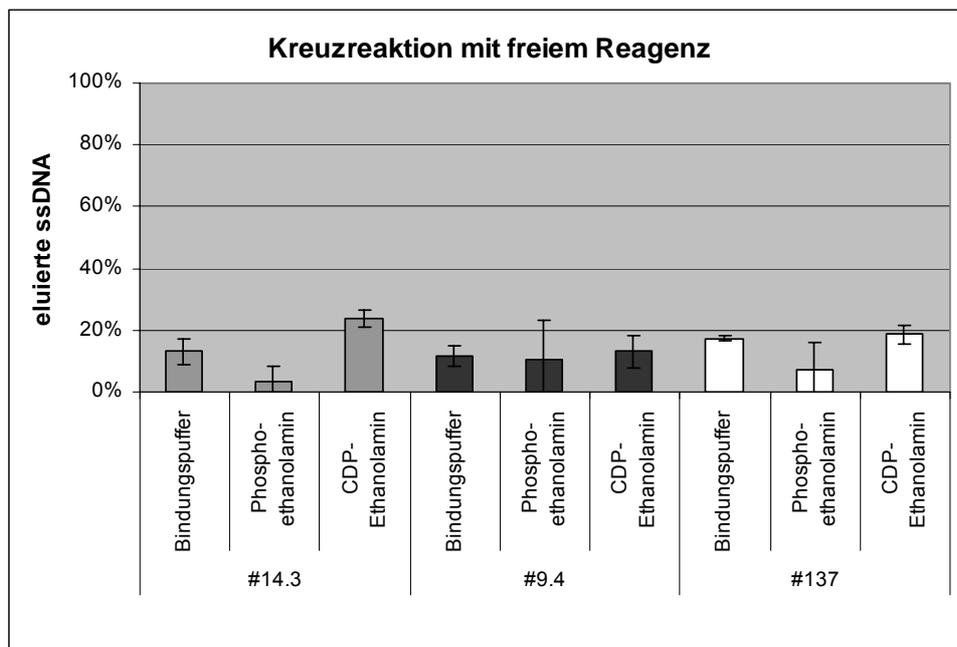


Abb. 5.38: Affinitätselutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 an phosphorylierte Ethanolamin-Verbindungen (Phosphoethanolamin, CDP-Ethanolamin)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Phosphocolamin oder CDP-Ethanolamin. Nach der Affinitätselution wurde der pH-Wert des Eluates, welches Phosphocolamin enthielt auf einen Wert von pH 7,3 mit 0,1M NaOH korrigiert. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (grau [#14.3], schwarz [#9.4] oder weiß [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Es erfolgte keine Bindung der getesteten Aptamere an die phosphorylierten Ethanolaminverbindungen. Der mit CDP-Ethanolamin eluierte Anteil an ssDNA (~20 %) war nicht höher als die durch Bindungspuffer abgewaschenen ssDNA Mengen. Mit Phosphocolamin wurden noch geringere Mengen an eluierter ssDNA nachgewiesen (~5 %).

Affinität zu funktionell ähnlichen Molekülen

Wie in Kapitel 3.3.2 bereits erwähnt, stellt Ethanolamin eine der wichtigsten polaren Kopfgruppen in Phospholipiden dar. Andere und mit Ethanolamin eng verwandte Moleküle mit gleichen funktionellen Eigenschaften sind Cholin und Serin. Die Synthesewege der aus diesen drei Hydroxyverbindungen gebildeten Phospholipide sind stark miteinander verzahnt. Es war daher wichtig, herauszufinden ob die selektierten Aptamere diese funktionell und strukturell sehr ähnlichen Moleküle voneinander diskriminieren können. Aus diesem Grund wurden Affinitätselutions-Versuche mit Cholin und Serin durchgeführt.

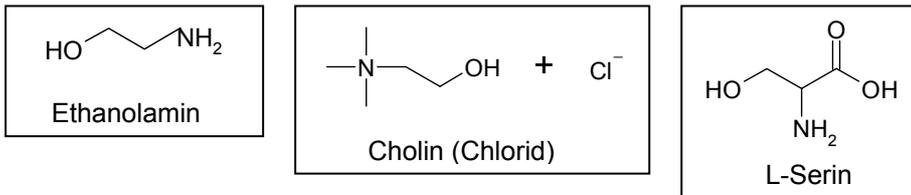


Abb. 5.39: Strukturformeln von Ethanolamin, Cholin und Serin

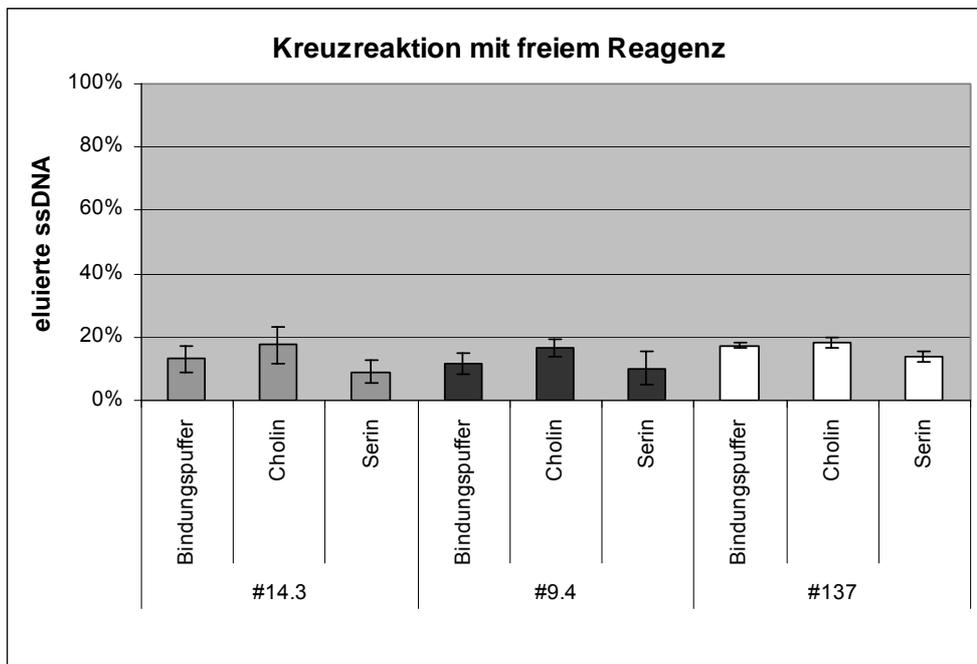


Abb. 5.40: Affinitäts-Elutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu funktionell ähnlichen Molekülen (Cholin, Serin)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Cholin-Chlorid oder Serin. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (grau [#14.3], schwarz [#9.4] oder weiß [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt.

Aus dem Diagramm ist zu erkennen, dass alle drei Aptamere die funktionell ähnlichen Moleküle deutlich von Ethanolamin unterscheiden können. Keine der beiden getesteten Verbindungen wurde von den Aptameren erkannt. Der Anteil der eluierten ssDNA-Mengen (8-19 %) übersteigt den Betrag der Negativkontrolle nicht. Die Unterschiede bei der Bindung der einzelnen Oligonukleotidklone sind vernachlässigbar klein.

Affinität zu ausgewählten Aminosäuren

Mit den folgenden Versuchen sollte die Affinität der Aptamere zu verschiedenen Aminosäuren untersucht werden. Die ausgewählten Aminosäuren Glycin, β -Alanin, Lysin und Arginin sind im weitesten Sinne strukturverwandt mit Ethanolamin. Sie wurden ausgewählt, weil sie kleine einfach aufgebaute Moleküle sind, welche eine kettenförmige Grundstruktur besitzen und keine aromatischen oder heterozyklischen Anteile enthalten.

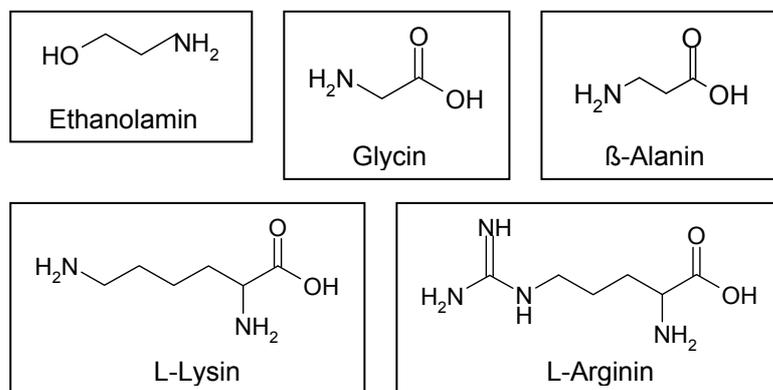


Abb. 5.41: Strukturformeln von Ethanolamin, Glycin, β -Alanin, Lysin und Arginin

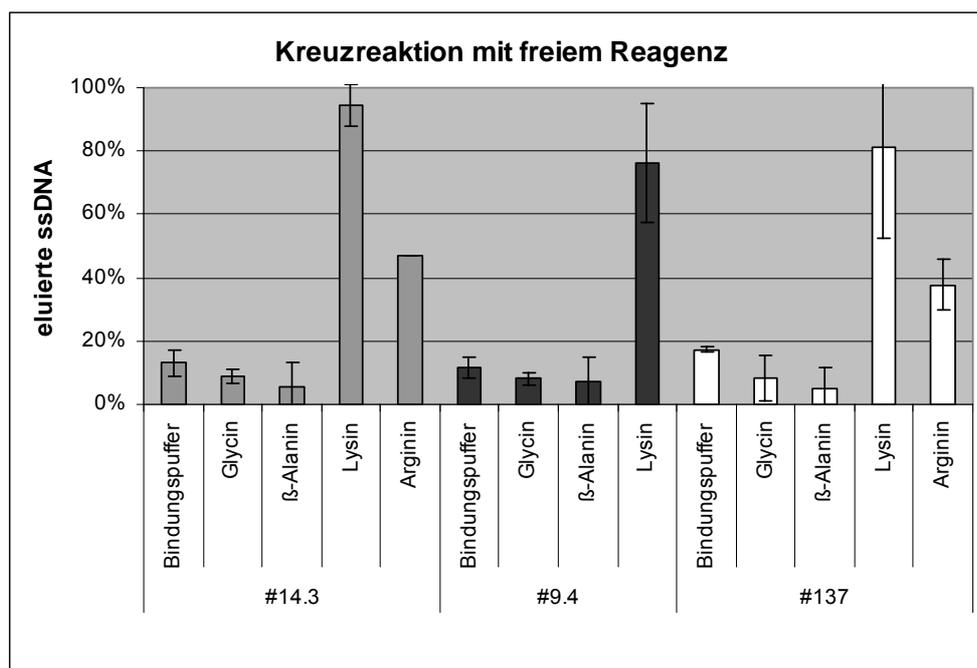


Abb. 5.42: Affinitäts-Elutions-Versuche zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Aptamere #14.3, #9.4 und #137 zu ausgewählten Aminosäuren (Glycin, β -Alanin, Lysin, Arginin)

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden und die entstandenen Bindungskomplexe gewaschen. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM frei in Lösung vorliegendem Glycin, β -Alanin, Lysin oder Arginin. Als Negativkontrolle diente Bindungspuffer ohne Reagenzienzusatz. Die verbliebenen Bindungskomplexe wurden gewaschen, gefolgt von einer Hitzeelution, um alle restlichen, Bead-gebundenen Aptamere zu eluieren. Der Anteil der affinitätseluierten ssDNA (**grau** [#14.3], **schwarz** [#9.4] oder **weiß** [#137]) wurde prozentual zur gesamten eluierten ssDNA dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass bei der Auswertung der Anteil an Eigenfluoreszenz bei Lysin (s.o.) von den gemessenen Werten der entsprechenden Elutionsfraktionen abgezogen wurde.

Für die beiden kleineren Aminosäuren Glycin und β -Alanin, welche lediglich aus den zwei funktionellen Gruppen (Amino- und Carboxylgruppe) und einem einfachen Kohlenstoff-Grundgerüst bestehen, konnte keine Bindung zu den Aptameren festgestellt werden.

Lysin, welches eine zusätzliche Aminogruppe besitzt, wurde gut erkannt. Die beste Bindung zeigte Aptamer #14.3. Hier konnten ~90 % der gebundenen Aptamere eluiert werden. Aber auch bei den beiden anderen Aptameren #9.4 und #137 konnte eine Bindung zu Lysin nachgewiesen werden. In diesem Fall wurden 75–81 % der gebundenen Aptamere von den Beads eluiert.

Mit dem etwas komplizierter aufgebauten Arginin konnte ~50 % ssDNA des Aptamers #14.3 eluiert werden; im Falle von Aptamer #137 lag dieser Anteil bei etwas über 45 % (siehe Abb. 5.42). Aptamer #9.4 war in diese Untersuchungen nicht mit einbezogen.

Zusammengefasst zeigten die untersuchten Aptamere im Wesentlichen folgende Resultate:

- keine Bindung an Ethanol (keine Amino-Gruppe)
- Moleküle ohne Hydroxyl-Gruppe werden gebunden (Di-, Triethylamin)
- Moleküle mit verlängerten Ketten (Amino-Butanol, Amino-Hexanol) werden gut erkannt
- Bindung an Moleküle mit Ethylamin-Gruppen, bei denen das Stickstoffatom als primäres, sekundäres oder tertiäres Amin vorliegt (Mono-, Di- und Triethanolamin, Di- und Triethylamin, Amino-Butanol, Amino-Hexanol, Methylamino-Ethanol, Phenoxyethylamin, Lysin, Arginin,)
- keine Bindung an Moleküle, die lediglich quartäre Amine (Cholin) oder Aminogruppen in ionisierter Form (Glycin, Serin, β -Alanin) enthalten
- phosphorylierte Ethanolaminverbindungen werden nicht gebunden (Phosphocolamin, CDP-Ethanolamin)

6 Diskussion und Ausblick

6.1 Selektion von Aptameren für Schimmelpilzbestandteile

Schimmelpilze sind natürlicher Bestandteil unserer Umwelt. In Innenräumen sollte ein Schimmelpilzwachstum jedoch vermieden werden. Die Gründe hierfür sind vielfältig, denn Schimmelpilze können eine reizende, allergische, toxische oder auch infektiöse Wirkung besitzen: z.B. geben epidemiologische Studien Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Schimmelpilzexpositionen und Atemwegsbeschwerden (*Pitten, 1999; Bornehag et al., 2000; Müller et al., 2002*).

Bisher etablierte Nachweismethoden für einen Schimmelpilzbefall sind meist sehr zeit-, personal- und kostenintensiv. Neben den klassischen Verfahren, wie mikroskopische Begutachtung und Anlegen von Pilzkulturen zur genaueren Bestimmung der entsprechenden Pilzspezies (*Fleischmann, 2003*), wird in jüngster Zeit verstärkt nach Möglichkeiten für alternative, schnellere und einfacher zu standardisierende Nachweise gesucht. So sind in der Literatur bereits immunologische (*Li et al., 2000; Fuhrmann et al., 1992*), sowie molekularbiologische (Gensonden: *Einsele et al., 1997*; Identifikation mittels PCR: *Edel, 1998*) Methoden beschrieben, ebenso wie die Bestimmung von nach außen abgegebenen Substanzen (MVOC: *Keller et al., 1998; Moriske, 2001*; Mykotoxine: *Pasanen, 2001*) und einzelner Zellwandbestandteile (*Kamphuis, 1992; Chew et al., 2001; Axelsson et al., 1995; Miller & Young 1997*). Eine genauere Aufstellung der bisher genutzten Nachweismethoden findet sich in Kapitel 3.3.1.2. Aptamere bieten die Möglichkeit für eine neue Nachweismethode. Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle, die ein Target binden können, indem sie passgenau für das Zielmolekül eine bestimmte dreidimensionale Struktur einnehmen (siehe auch Kap. 3.2). Die Anwendung der Aptamere als neue biologische Erkennungselemente in Biosensoren (siehe Kap. 3.1) ermöglicht mit diesen Sensoren einen einfachen und schnellen Nachweis von Schimmelpilzbefall.

Zur Gewinnung von Aptameren wird eine speziell an das jeweilige Target angepasste *in vitro* Selektionstechnik, der so genannte SELEX-Prozess genutzt.

Eine Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, Aptamere zu generieren, die, in einem Biosensor eingesetzt, Schimmelpilzkontaminationen relativ einfach und frühzeitig aufzeigen können. Als Modellorganismen wurden die für problematischen Schimmelpilzbefall in Wohnräumen bekannten Spezies *Aspergillus versicolor* und *Penicillium expansum* ausgewählt (*Müller & Herbarth, 1999; Engelhardt et al., 2002*). Gearbeitet wurde mit den ungeschlechtlichen Sporen der Pilze, den Konidien.

6.1.1 Selektionsexperimente für ganze Schimmelpilzsporen

Für die Experimente zur Selektion schimmelpilzspezifischer Aptamere wurden zunächst ganze Schimmelpilzsporen genutzt. Der Einsatz intakter Sporen schien sinnvoll aus den in Kapitel 3.3.1.3 genannten Gründen, bezüglich der Verfügbarkeit und Handhabbarkeit. Hinzu kommt ein Aspekt der Methode der *in vitro* Selektionen gegen komplexe Targets, den Blank (*Blank, 2002*) wie folgt, beschreibt: „SELEX gegen ganze biologische Einheiten – Komplex-SELEX genannt – ist unabhängig von Kenntnissen über ihre Zusammensetzung. Es hat somit das Potenzial zur Identifizierung sowohl von unbekanntem Proteinen als auch von

Proteinen, deren Vorhandensein in bestimmten biologischen Einheiten nicht vermutet wurde. Selektionen gegen intakte biologische Einheiten können ein effizientes Mittel sein, um biologische Systeme [...] zu untersuchen.“

In vorangegangenen Versuchen (*Kirsten, 2001; Stoltenburg & Strehlitz, 2003*) wurde bereits festgestellt, dass eine Anreicherung von spezifischen Aptameren für unbehandelte Konidien nicht möglich ist. Besonders die starke Hydrophobizität der äußeren Sporenhülle durch die in der „Rodlet Layer“ (parkettartige Stäbchenschicht der Konidienoberfläche) vorhandenen Hydrophobine scheint, neben anderen möglichen Ursachen, dafür verantwortlich zu sein (*Kershaw & Talbot, 1998; Girardin et al., 1999; Wessels, 1999*). So wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Oberflächen der Sporen durch verschiedene Vorbehandlungsschritte so aufzubereiten, dass die Strukturen unter der stark hydrophoben Außenhülle für die Oligonukleotide zugänglich sind. Die Schimmelpilzsporen wurden dafür einerseits vor Beginn der *in vitro* Selektion einer Hitzebehandlung bei 80°C unterzogen. Andererseits wurden die Sporenoberflächen mittels Quellung aufgebrochen (siehe Kap 5.1.1.1). Eine Anreicherung sporenspezifischer Aptamere konnte mit beiden Versuchsansätzen nicht erzielt werden. Insbesondere im Falle der vorgequollenen Konidien konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erlangt werden. Durch unspezifische Artefakte wurden bei der fluorimetrischen Auswertung des selektierten (von den Sporen eluierten) Oligonukleotidpools jeder einzelnen Runde recht hohe Fluoreszenzwerte gemessen, die aber keine Aussage über die tatsächlich eluierte ssDNA-Menge zuließen. Wahrscheinlich sind diese Werte auf Stoffe zurückzuführen, die aus den Zellwänden heraus gelöst werden.

Auch eine Änderung der Elutionsmethode erbrachte keine Verbesserung. Hierbei handelte es sich um eine Affinitätselution, mit dem Ziel, jene Oligonukleotide, die spezifisch an β -Glucan (als ein Hauptbestandteil der Sporenwände) gebunden haben, zu eluieren und damit zu selektieren. Durch die Elution mit β -Glucan konnte zwar die Elution und Messung unspezifischer Bestandteile umgangen werden, aber eine Anreicherung sporenspezifischer Oligonukleotide erfolgte nicht.

Eine Erklärung für das Nichtgelingen könnten die inhomogenen, variierenden Oberflächen sein. Ganze Schimmelpilzsporen sind ein sehr komplexes Target. In der Literatur sind zwar Aptamerselektionen gegen umfassende Zellsysteme bzw. ganze Mikroorganismen bereits beschrieben (*Homann & Goringe, 1999; Pan et al., 1995; Blank et al., 2001*), aber dennoch stellt eine Selektion gegen ein derart komplexes Target immer eine große Herausforderung dar (*Blank, 2002*). Eine gezieltere Selektion in Richtung einzelner Bestandteile hätte bei Vorliegen von umfassenderen Erkenntnissen über die Bestandteile sowie der Oberflächenstruktur von Konidien durchgeführt werden können. Leider sind aber bisher zu wenige Fakten diesbezüglich bekannt (*Bernard & Latge, 2001*).

6.1.2 Selektionsexperimente für β -Glucan

Nachdem die Aptamerselektion mit dem gesamten komplexen System (Konidien) nicht zum Erfolg führte, war der nächste Schritt, einen einzelnen definierten Sporenbestandteil als Target einzusetzen. Die Motivation dafür war, durch diese gezielte Selektion für nur eine relevante Substanz Wechselwirkungen der Bestandteile untereinander zu vermeiden, sowie eine eventuelle Anreicherung von Oligonukleotiden für nicht relevante Sporenbestandteile von vornherein auszuschließen.

Nach der Literaturrecherche zeigte sich, dass über die Inhaltsstoffe der Konidien der ausgewählten Arten *Aspergillus versicolor* und *Penicillium expansum* derzeit noch keine umfassenden Kenntnisse vorliegen. Dennoch wurden bereits Arbeiten über Bestandteile von Sporen anderer Spezies veröffentlicht. Eine Zusammenstellung derartiger Pilzkomponenten findet sich im Kapitel 3.3.1.3. Schlussfolgernd aus diesen Arbeiten wurde mit β -1,3-Glucan als Target gearbeitet. Neben den Mykotoxinen hat β -1,3-Glucan, ein Bestandteil der Hyphen- und Sporenwand, verschiedene, meist negative Wirkungen auf das Immunsystem (*Flannigan & Miller, 1994*). So wurde die toxische, inflammatorische Wirkung des Polysaccharides bereits mehrfach nachgewiesen (*Iwamoto et al., 1998; Beijer et al., 2003*). In Sporen von Schimmelpilzen liegt ein lineares β -1,3-D-Glucan mit 1,6-Seitenketten vor (*Kurtz & Douglas, 1997; Borgia & Dodge, 1992; Chew et al., 2001*). Diesem sehr ähnlich und kommerziell verfügbar ist Laminarin, ein Glucan aus *Laminaria digitata*, einer Meeresalge. Es wurde bereits erfolgreich zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern für die Detektion von Schimmelpilzkontaminationen mit immunologischen Nachweismethoden genutzt (*Douwes et al., 1996; Milton et al., 2001*).

Das Laminarin wurde auf Magnetic Beads immobilisiert und in dieser Form als Target im SELEX eingesetzt („Target-Beads“). Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf den Magnetic Beads während der Immobilisierungsprozedur kamen Ethanolamin oder BSA zum Einsatz (siehe Kap. 4.5.3.3).

Im Ergebnis wurde beobachtet, dass trotz der vorgeschalteten Negativselektionen (Einsatz von „Negativ-Beads“ mit immobilisiertem Ethanolamin oder BSA) immer wieder eine Anreicherung von Oligonukleotiden für die Blockierungssubstanzen, vor allem für Ethanolamin, erfolgte. Erst die Durchführung der eigentlichen Bindungsreaktion (bei SELEX-Experimenten mit BSA als Blocker) in Gegenwart eines zusätzlichen BSA-Überschusses, verhinderte die Anreicherung von ssDNA für die Negativ-Beads. Allerdings konnte auch keine spezifische ssDNA für Laminarin angereichert werden. Weder eine Hitze-Elution potentiell gebundener Oligonukleotide von den Target-Beads, noch eine Affinitätselution mit Laminarin brachten Erfolg (siehe Kap. 5.1.1.2).

Auch eine Variation des eingesetzten Oligonukleotidpools verbesserte das Ergebnis nicht. So kamen sowohl die Ausgangsbibliothek BANK-A, als auch ein an vorgequollenen Sporen vorselektierter ssDNA-Pool zum Einsatz (Kap. 5.1.1.1 und 5.1.1.2).

Dass keine Aptamerselektion für das Polysaccharid β -Glucan stattgefunden hat, könnte an strukturellen Gegebenheiten des Targets liegen. Aptamerselektionen für Kohlenhydrate scheinen im Allgemeinen schwieriger zu sein, als beispielsweise für Proteine. Fickert *et al.* (*Fickert et al., 2006*) schreiben dazu⁷: „Carbohydrates lack charged groups and aromatic ring structures, both motifs known to direct strong aptamer-target interactions. They only have hydroxyl groups, which are likely to form non-covalent bonds. Therefore it is not surprising that mainly lower affinities were obtained for carbohydrate aptamers.“

⁷ Übersetzung: Kohlenhydrate besitzen keine geladenen Gruppen oder aromatische Ringstrukturen, welche beide für starke Aptamer-Target-Interaktionen bekannt sind. Sie haben nur die Hydroxylgruppen, die in der Lage sind, nichtkovalente Bindungen auszubilden. Daher ist es nicht überraschend, dass Oligonukleotide bzw. Aptamere keine solch hohe Affinität zu Kohlenhydraten haben.

Dennoch sind bereits gelungene Aptamerselektionen für Zuckerverbindungen in der Literatur beschrieben. Meist handelt es sich dabei aber um aminoglykosidische Verbindungen (Streptomycin: *Tereshko et al., 2003*; Tobramycin: *Wang & Rando, 1995*) oder sehr einfach strukturierte Zucker (Galaktose: *Kawakami et al., 1998*; sialyl Lewis X, ein tetrasaccharidisches Glykokonjugat von Membranproteinen: *Jeong et al., 2001*). Aber auch Aptamere für langkettige Polysaccharide ohne Aminostrukturen wurden bereits generiert (Zellulose: *Yang et al., 1998*; Dextran: *Srisawat et al., 2001*). Diese weisen zwar meist geringe Affinitäten (höhere K_D -Werte), aber eine hohe Spezifität auf (*Gold et al., 1995*). Das zeigt, dass eine Selektion von Aptameren für Zuckerstrukturen prinzipiell möglich ist.

6.1.3 Aptamere für die lösliche Sporenfraktion

Da die oben erwähnten Strategien nicht erfolgreich waren, wurden Möglichkeiten gesucht, das Target im SELEX-Prozess in einer für eine Aptamerselektion effektiveren Form anzubieten. Aus diesem Grunde wurden die Sporen aufgeschlossen, die entstehende lösliche Sporenfraktion auf Magnetic Beads (Epoxy-funktionalisierte Oberfläche) immobilisiert und diese als Target im SELEX eingesetzt. Die Immobilisierungsbedingungen wurden dabei so gewählt, dass sie günstiger für die Fixierung von Proteinen waren, und wahrscheinlich keine Zucker auf den Target-Beads immobilisiert wurden. Eine Immobilisierung von Kohlehydraten an eine Epoxy-Oberfläche findet eher im stark basischen Milieu statt, da die OH-Gruppen für die Kopplung einen hohen pH-Wert benötigen (*Murthy & Moudgal, 1986*). Dementsprechend wurde im vorliegenden Fall im neutralen pH-Bereich gearbeitet. Theoretisch könnten jedoch alle Konidienbestandteile, die eine freie OH-, SH- oder NH_2 -Gruppe besitzen, auf der Epoxy-funktionalisierten Oberfläche der verwendeten Beads gebunden haben (siehe Dynal Produktinformation).

Für die Selektion kam die lösliche Sporenfraktion von *Penicillium expansum* zum Einsatz. Zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen auf den Beads während der Immobilisierungsprozedur wurde in diesem Fall Tris(hydroxymethyl)-aminomethan verwendet. Diese Substanz war ohnehin Bestandteil des SELEX-Bindungspuffers. Somit wurde keine weitere Substanz in den Prozess eingeführt, wodurch eine Oligonukleotidanreicherung für zusätzlich eingeführte Blockierungssubstanzen vermieden werden sollte.

Mit dieser Strategie gelang es schließlich, Oligonukleotide zu gewinnen, die Bestandteile von *Penicillium expansum* Sporen erkennen. Ein Kontrollversuch mit der löslichen Sporenfraktion von *Penicillium brevicompactum* zeigte nur eine 50 %ige Erkennung (siehe Kap. 5.1.1.3), was die relative Spezifität der selektierten Oligonukleotide für *Penicillium expansum* Sporen unterstreicht. Dieses Ergebnis zeigt, dass im angereicherten Oligonukleotidpool Aptamere enthalten sind, die selektiv speziesspezifische Bestandteile binden können. Der angereicherte Aptamerpool stellt somit ein charakteristisches Gemisch analog eines polyklonalen Antikörperserums dar (*Bruno & Kiel, 1999*). Jedoch können diesem Pool auch Oligonukleotide zugehören, die entweder unspezifisch binden oder aber Schimmelpilze artenübergreifend erkennen. Zur weiteren Aufklärung wurde daher ein Teil der erhaltenen Aptamere vereinzelt, sequenziert und verschiedene Bindungsversuche durchgeführt.

Die Sequenzierung von 37 Aptamerklonen aus dem selektierten Pool ergab, dass eine signifikante Anreicherung einiger weniger Aptamere erfolgt war. Diese ließen sich in Sequenzvergleichen in neun Gruppen einordnen. Ein einheitliches Konsensusmotiv konnte

nicht aufgezeigt werden, wenngleich in Sequenzalignments homologe Sequenzabschnitte ausgemacht wurden, die in jeweils unterschiedlichen Gruppen wieder zu finden waren (siehe Kap. 5.1.2). Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass in vergleichbaren SELEX-Prozeduren für komplexe Targets, im Gegensatz zu solchen für definierte Einzelsubstanzen (z.B. Proteine), meist mehrere Aptarmotive gefunden wurden, die untereinander keine Ähnlichkeit haben (*Cerchia et al., 2005; Blank et al., 2001; Morris et al., 1998*).

Für die nachfolgenden Bindungsstudien wurde je ein Vertreter jeder Sequenzgruppe herangezogen. Es wurden Bindungsversuche mit immobilisiertem Target, Messungen im IAsys-Affinitätssensor und Affinitätsreinigungsversuche mit Hilfe der Aptamere durchgeführt.

Zunächst wurden Tests mit immobilisiertem Target analog der Bindung im SELEX-Prozess durchgeführt. Diese zeigten, dass im Falle von zwei Aptamergruppen (Gruppe VI und VII) eine Anreicherung für die Negativ-Beads (Epoxy-Beads, behandelt mit PBS und Protease-Inhibitor) erfolgt war. Das verwunderte insofern, da eine Counter-Selektion mit Negativ-Beads in jeder SELEX-Runde durchgeführt worden war. Dennoch beschreiben auch andere Autoren das Phänomen, dass trotz erfolgter Negativ-Selektionen unerwartete falsch-positive Ergebnisse erzielt wurden. So finden *Cerchia et al.* (*Cerchia et al., 2005*) eine Bindung ihrer selektierten Aptamere zu Zellen, für die eigentlich eine Counter-Selektion vorgeschaltet worden war.

Die Ergebnisse der Bindungsversuche mit Aptameren aus den anderen Gruppen (Gruppen I – V, VIII, IX) zeigten zwar prinzipiell eine Bindung dieser Aptamere an die Target-Beads, ließen aber auf Grund der sehr niedrigen Bindungswerte, die teilweise nahe der Nachweisgrenze der Quantifizierungsmethode über direkte Fluoreszenzmessung lagen (*Stoltenburg & Strehlitz, 2003*), keine abschließenden Aussagen über das Bindeverhalten der selektierten Aptamere zu. Diese geringen Werte lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass ausgehend von dem äußerst komplexen Target-Gemisch (immobilisierte lösliche Sporenfraktion), eine enge Selektion für nur einen oder wenige Sporenbestandteile erfolgt war. Da diese Substanzen als Teil des Gemisches wahrscheinlich nur in geringem Maße auf den Target-Beads vorhanden sind, konnten auch nur wenige ssDNA-Moleküle binden. Dies führte zu den gemessenen kleinen Fluoreszenzwerten. Eine drastische Erhöhung der Menge an Target-Beads zur Optimierung der Messwerte war aus ökonomischen Gründen nicht möglich.

Weitere Bindungsversuche wurden in einem optischen Biosensor durchgeführt. Der IAsys-Affinitätssensor identifiziert molekulare Wechselwirkungen markierungsfrei auf Grundlage des Resonant Mirror Prinzips (*Buckle et al., 1993; Cush et al., 1993*). Dabei wird ein evaneszentes Feld zur Detektion von Reaktionen an der Sensoroberfläche genutzt (siehe Kap. 3.1.2). In der Literatur gibt es eine Reihe von Beispielen, bei denen die Aptamer-Target-Bindung mit Hilfe von Evaneszent-Feld-Biosensoren nachgewiesen wurde (*Hamm, 1996; Osborne et al., 1997; Müller & Göringer, 2002; Zue et al., 2006*).

Die Aptamere wurden auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Die lösliche Sporenfraktion wurde nach dem Aufschluss in der Kugelmühle lediglich abzentrifugiert und unbehandelt zur Messung mit den auf der Sensoroberfläche immobilisierten Aptameren gegeben. Dieser praxisbezogene Ansatz wurde gewählt mit Blick auf eine spätere Anwendung, bei der eine einfache und unkomplizierte Handhabung ohne umfangreiche Probenaufarbeitungsschritte gewährleistet sein sollte. Jedoch war der Nachweis der Bindung der selektierten Aptamere

zur löslichen Sporenfraktion mit diesem Verfahren nicht möglich. Bei Kontrollversuchen mit anderen Sensoroberflächen wurde festgestellt, dass sich offensichtlich einzelne Sporenbestandteile unspezifisch ablagern und so die Messungen erheblich stören (siehe Kap. 5.1.3.2). Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zuckerverbindungen. Morozova *et al.* (Morozova *et al.*, 2002) finden in den Sporen von *Aspergillus* spp. einen Kohlenhydratanteil von mehr als 30%, wobei sie im Cytosol ruhender Konidien vor allem Trehalose (31,1 % des cytosolischen Zuckeranteils) und Glucose (2,9 %), sowie die Zuckeralkohole Mannitol (42,1 %), Arabitol (11,6 %), Erithritol (6,4 %) und Glycerol (5,9 %) identifizieren. Daneben spielen β -Glucan (Kurtz & Douglas, 1997; Borgia & Dodge, 1992; Chew *et al.*, 2001) und verschiedene Glykoproteine (Cao *et al.*, 1998; Tronchin *et al.*, 1997) eine Rolle. Die Kohlenhydrate und Glykoverbindungen zeichnen wahrscheinlich auch für den „Signal-Shift“ verantwortlich, der nach Zugabe des löslichen Sporenextraktes auf die Sensoroberfläche aufgezeichnet wurde (siehe Kap. 5.1.3.2). Die Änderung der Viskosität der Messlösung ist vermutlich die hauptsächliche Ursache dafür (Bicknese *et al.*, 1993). Eine vorherige Aufarbeitung des Materials, z.B. mittels Proteinfällung oder Ionenaustauschchromatographie (Burkert, 2006), zur Entfernung der Kohlenhydrate wäre eine Möglichkeit, um die Bindung störungsfrei nachweisen zu können. Allerdings besteht bei der Behandlung der löslichen Sporenfraktion die Gefahr, dass Aptamer-bindende Bestandteile entfernt oder verändert würden.

Die Bindung der Aptamere zu einzelnen Sporenproteinen konnte schließlich mit der Methode der Affinitätsaufreinigung nachgewiesen werden. Ein prinzipiell gleiches Verfahren zum Nachweis der Aptamer-Target-Bindung ist in der Arbeit von Daniels *et al.* (Daniels *et al.*, 2003) beschrieben. Zur Bildung einer Affinitätsmatrix wurden jeweils individuelle Aptamere auf Magnetic Beads immobilisiert. Diese separierten, entsprechend ihrer Affinität, bestimmte Bestandteile aus dem komplexen Gemisch des Sporenaufschlusses. Die Affinitätsaufreinigung wurde mit drei Aptameren durchgeführt, ApPilz #1310 (Gruppe I), ApPilz #75 (Gruppe III) und ApPilz #109 (Gruppe VIII). In einer nachfolgenden Analyse per SDS-PAGE wurde festgestellt, dass jedes der drei Aptamere selektiv ein bzw. zwei Proteine aus dem Proteingemisch herausgetrennt hatte. Das Aptamer ApPilz #1310 erkannte ein Protein mit der Größe von ~80 kDa, während beim Einsatz der Aptamere ApPilz #75 und ApPilz #109 jeweils zwei Banden im höhermolekularen Bereich (> 120 kDa) gefunden wurden. Leider waren die Mengen an separierten Proteinen so gering, dass eine weitergehende, detailliertere Analyse der entsprechenden Sporenproteine zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erfolgen konnte. Eine Zuordnung der entsprechenden Bestandteile lediglich auf Grund ihrer Größe und ihres Laufverhaltens in der SDS-PAGE ist nicht möglich. In nachfolgenden Untersuchungen soll mit Hilfe verschiedener Proteinanalyseverfahren geklärt werden, welche Proteine selektiv von den Aptameren erkannt werden.

Ein Vergleich mit Arbeiten von Ribbert (Ribbert, 2004), der Antikörper gegen den Extrakt von Ascosporen des Apfelschimmels *Venturia inaequalis* herstellte, zeigt eine Ähnlichkeit zu den hier erzielten Ergebnissen. Auch er findet bei Reaktion seines polyklonalen Antikörperserums mit dem Konidienextrakt eine Proteindoppelbande im SDS-PAA-Gel, welche ungefähr im gleichen Größenbereich liegt wie die in dieser Arbeit mit den Aptameren ApPilz#75 und ApPilz#109 detektierten Proteine der löslichen Sporenfraktion. Da in der

Arbeit von Ribbert das Hauptaugenmerk auf der Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen ein Antigen der Ascosporen lag, wurden die Proteinbanden dort nicht näher charakterisiert.

6.1.4 Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial

Auch wenn noch weitere Untersuchungen nötig sind, so zeigen die hier präsentierten Ergebnisse doch, dass es gelungen ist, Aptamere für Schimmelpilzsporen zu selektieren. Wichtige nachfolgende Arbeiten betreffen die Analyse der durch die Aptamere separierten Proteine mit Hilfe der Methode der Massenspektrometrie und anderen Proteinanalyseverfahren. Eine entsprechende Kooperation ist bereits in Vorbereitung. Vor allem gilt es zu klären, ob die Proteine charakteristisch für *Penicillium expansum* Sporen sind oder auch in verwandten Arten vorkommen. Weiterhin ist es notwendig, die Spezifität und Affinität der Aptamere zu bestimmen. Dabei ist es denkbar, für die spätere Anwendung in einem Test oder Biosensor sowohl individuelle Aptamere als auch den selektierten Aptamerpool der achten Runde des SELEX SP13 zu verwenden. Darüber hinaus sollte eine weiterführende Analyse des polyklonalen Aptamerpools durchgeführt werden. Es ist möglich, dass dabei zusätzlich Einzelaptamere gefunden werden, die in der Lage sind, speziescharakterisierende Sporenbestandteile zu identifizieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dieser Arbeit ein erster großer Schritt gelungen ist, um sporenspezifische Aptamere herzustellen. Diese Aptamere könnten, in Biosensoren eingesetzt, zur Detektion von Schimmelpilzkontaminationen in Innenräumen genutzt werden.

6.2 Selektion von Aptameren für Ethanolamin

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden Aptamere für Ethanolamin, ein besonders kleines und einfach strukturiertes Target gewonnen. Es besteht lediglich aus einem kurzen Kohlenstoff-Grundgerüst (2 C) und zwei funktionellen Gruppen (primäre Aminogruppe, Hydroxylgruppe). Ethanolamin ist nach jetzigem Kenntnisstand das bisher kleinste molekulare Aptamertarget (Mann *et al.*, 2005). Andere kleine Moleküle, für die Aptamere generiert wurden, wie ATP (Huizenga & Szostak, 1995), Arginin (Harada & Frankel, 1995) oder Galaktose (Kawakami *et al.*, 1998), verfügen sowohl über mehr funktionelle Gruppen, als auch über eine größere strukturelle Varianz, was die spezifische Erkennung durch ein Aptamer vereinfacht (Wilson & Szostak, 1999). Somit hat Ethanolamin neben seiner biologischen, medizinischen und industriellen Relevanz (siehe Kap. 3.3.2), vor allem auch eine Bedeutung als Modelltarget in der Aptamerforschung. Standardmethoden zum Nachweis von Ethanolamin sind verschiedene chromatographische Methoden, wie Gaschromatographie, Ionenchromatographie und HPLC (Pfeifer & Radler, 1992; Mrklas *et al.*, 2003).

6.2.1 SELEX-Prozess zur Gewinnung der Aptamere

Der SELEX-Prozess (SL1), in dem die Ethanolamin-spezifischen Oligonukleotide gewonnen wurden, war ursprünglich darauf ausgerichtet Aptamere für Laminarin (β -1,3-Glucan) als Rezeptoren zum Nachweis von Schimmelpilzkontaminationen in Raumluft, zu generieren (siehe Kap. 3.3.1.3 und 5.2.1). Ethanolamin wurde im Prozess nur in äußerst geringen

Mengen zur Absättigung von nicht belegten Bindungsstellen der mit Laminarin modifizierten Epoxy-Beads eingesetzt. Der Anteil von Ethanolamin auf den Beads betrug lediglich 4 %. Während acht Runden des SELEX-Prozesses war kein Anstieg an eluierter ssDNA messbar. Erst als in der neunten Runde Epoxy-Beads eingesetzt wurden, die ausschließlich mit Ethanolamin modifiziert waren, konnte die Anreicherung selektierter ssDNA gemessen werden. Um auszuschließen, dass sich Oligonukleotidstrukturen lediglich für die Matrixoberfläche angereichert hatten, wurden Kontrollversuche mit unbehandelten Epoxy-Beads und mit Ethanolamin-modifizierten Tosyl-Beads durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten deutlich, dass es sich bei dem angereicherten Oligonukleotidpool um Strukturen handelte, die Ethanolamin erkannten, unabhängig davon auf welcher Oberfläche es immobilisiert war (siehe Kap. 5.2.1).

Das Resultat dieses SELEX-Prozesses kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die Anreicherung von Aptameren nicht allein von der Menge des angebotenen Targets abhängt, sondern vielmehr von der Bindungsfähigkeit der Oligonukleotidstrukturen zu bestimmten Zielmolekülen. Diese Bindungsfähigkeit ist dabei abhängig von den Moleküleigenschaften des Targets, wie Aufbau, Struktur, Polarität oder Ladung. Zur experimentellen Untermauerung dieser Aussage müssten in künftigen Arbeiten vergleichende SELEX-Versuche mit unterschiedlichen Targetmengen und -zusammensetzungen durchgeführt werden. Dennoch gibt es in der Literatur Anhaltspunkte dafür, dass Aptamerselektionen für bestimmte Substanzen erfolgten, obwohl im SELEX-Prozess auch andere Moleküle eingesetzt worden waren (*Tahiri-Alaoui et al., 2002*). Als Indiz für die Bestätigung der oben genannten These dienen auch *in vitro* Selektionen für komplexe Targets, in denen das eigentliche Zielmolekül nur in geringem Maße vorhanden ist und dennoch eine gezielte Selektion für diese einzelnen Bestandteile erreicht wird (*Blank et al., 2001; Daniels et al., 2003*). Mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Affinität der Oligonukleotide zu bestimmten funktionellen Gruppen oder molekularen Regionen des Targets wahrscheinlich größer ist als zu anderen. Ein typisches Beispiel dafür sind u.a. die SELEX-Versuche von *Saran et al.* (*Saran et al., 2003*), bei denen sich bei der Aptamerselektion für Coenzym A immer wieder die Oligonukleotide durchsetzten, die die Adenosinanteile des Moleküls erkannten.

Im hier dargestellten SELEX-Prozess SL1 besaß das ursprünglich als Target eingesetzte Laminarin nur Hydroxylgruppen, welche keine so hohe Neigung für die Ausbildung von Aptamer-Target-Bindungen haben, wie die Aminogruppe des Ethanolamins (*Fickert et al., 2006*). Das könnte eine Erklärung für die in dieser Form stattgefundene Aptamerselektion für Ethanolamin sein.

Neben den Aptameren aus dem SELEX-Prozess SL1 wurde ein Teil der hier untersuchten Ethanolamin-spezifischen Aptamere in einem weiteren SELEX-Prozess SP13 erzeugt. In diesem Prozess war die lösliche Fraktion von Sporen des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* als Target eingesetzt worden. Einige der gewonnenen Aptamere (Gruppe II) zeigte nahezu die gleiche Sequenz auf, wie die im SELEX-Prozess SL1 erhaltenen Ethanolamin-spezifischen Aptamere. Dieses Phänomen wird eingehender im Kapitel 6.3 diskutiert.

6.2.2 Beurteilung der gewonnenen Aptamersequenzen

Die Sequenzierung des angereicherten Oligonukleotidpools zeigte deutlich, dass die im SELEX-Prozess SL1 gewonnenen Aptamere große strukturelle Ähnlichkeiten untereinander aufwiesen (siehe Kap. 5.2.2). Knapp 90% der sequenzierten Aptamere ließen sich in zwei Gruppen (Gruppe I → 57 %, Gruppe II → 30 %) einteilen, die einen 16-basigen Konsensusbereich mit sehr hohem Guanin-Anteil enthielten. Ein weiteres Oligonukleotid (#14.5, Gruppe IV) enthielt eine der Konsensussequenz sehr ähnliche Region. Nur 10 % der betrachteten Oligonukleotide (einzelne Sequenzen, die keiner Gruppe zuzuordnen waren) wiesen keinerlei Übereinstimmung mit den Basenabfolgen der zwei Hauptgruppen auf. Die ebenfalls untersuchten Aptamere der Gruppe II des SELEX-Prozesses SP13 waren nahezu identisch zu denen der Gruppe I aus SELEX SL1. Auch sie enthielten den sehr Guanin-reichen Konsensusbereich. In der Literatur sind zahlreiche Aptamere beschrieben, die Guanin-reiche Regionen beinhalten (z.B.: *Okazawa et al., 2000; Yang et al., 1998*). Dazu gehören auch die bekanntesten und meist untersuchten Aptamere: anti-Thrombin- (*Macaya et al., 1993*) und anti-HIV1-Integrase-Aptamer (*Jing & Hogan, 1998*). Die Guanin-reichen Regionen kommen häufig in einem bestimmten Muster vor und organisieren sich in G-Quartetts (auch Guanin Tetrade). Mehrere vertikal gestapelte G-Quartette bilden eine G-Quadruplexstruktur. Jedes beteiligte Guanin ist in vier Hoogsteen-Wasserstoff-Brückenbindungen involviert. Das G-Quartett gewinnt dadurch an Stabilität (*Davis, 2004*). In Abbildung 6.1 sind solche Strukturen dargestellt.

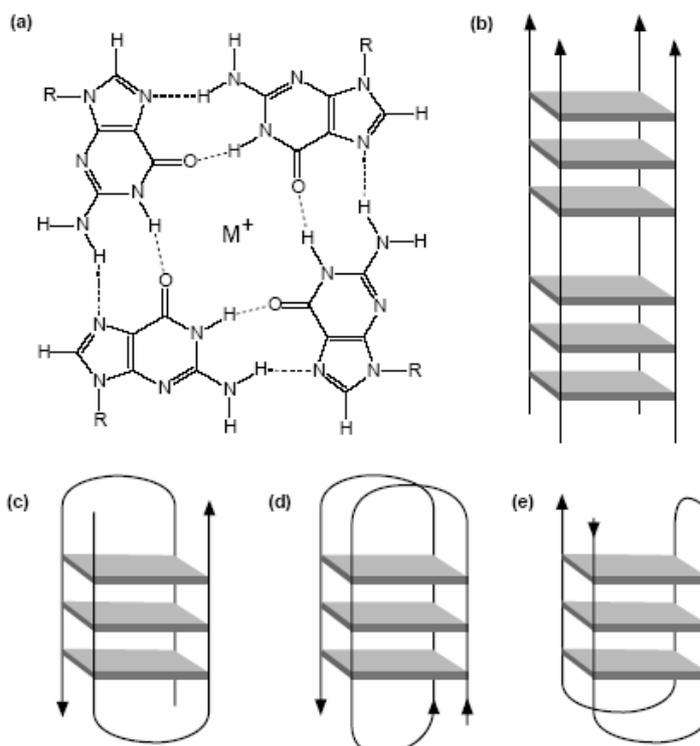


Abb. 6.1: **G-Tetrade und G-Quadruplexe**

- a) Vier Guanin-Einheiten bilden ein planares G-Quartett über Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen aus.
 - b) Parallele G-Quadruplexstruktur aus vier Einzelsträngen
 - c) Antiparallele G-Quadruplexstruktur aus zwei Einzelsträngen
 - d) und e) Intramolekulare G-Quadruplexstrukturen
- Die Ecken eines Quadrates sind jeweils mit Guanin besetzt.
(aus: *Rezler et al., 2002*)

In natürlicher Umgebung treten diese Strukturen häufig in eukaryontischen Zellen auf, z.B. in Telomeren oder in den Promoter-Regionen einiger Oncogene. Es wird vermutet, dass sie dort von biologischer Relevanz sind (*Simonsson, 2001; Shafer & Smirnov, 2001*).

Die charakteristische Konsensussequenz der Ethanolamin-Aptamere weist eine annähernd vierfache Wiederholung eines Guanin-Triplets, unterbrochen von je einem Thymin- oder Cytosin-Nukleotid ($GAG_2YG_3TG_3TG_3$) auf. Auch das Aptamer der Gruppe IV (#14.5), dessen Guanin-reiche Region nicht exakt mit dem Konsensusbereich übereinstimmt, zeigt eine annähernd vierfache Wiederholung eines Guanin-Triplets, unterbrochen jedoch von Thymin oder Adenin ($G_3TG_3AGTG_2TG_3$). Diese Sequenzen könnten eine Quadruplexstruktur ausbilden. Weitere Fakten sprechen dafür, dass sich im vorliegenden Fall G-Quartetts geformt haben. So beschreiben mehrere Autoren (u.a. *Simonsson, 2001; Davis, 2004*), dass Quadruplexstrukturen häufig durch Kationen stabilisiert werden, welche sehr gut in die durch die Stapelung der G-Quartetts gebildeten Aushöhlungen passen. Die Koordinierung der Quadruplexe mit bestimmten, einwertigen Kationen, vor allem K^+ , steigert sowohl die thermodynamische, als auch die kinetische Stabilität des Komplexes durch Reaktion mit den Carbonyl-Sauerstoff-Atomen. Der durchgeführte SELEX-Prozess fand in einem K^+ -haltigen Puffer statt, so dass hierdurch wahrscheinlich die Ausbildung von Quadruplexen begünstigt war. Auch die hypothetischen Sekundärstrukturen, bei denen die Konsensussequenzen jeweils in einem großen Loop lokalisiert waren (siehe Abb. 5.21 und 5.22), weisen auf eine solche strukturelle Organisation hin. Diese könnte entweder zu einer erhöhten Stabilität des Aptamers beitragen oder eine Rolle bei der Erkennung des Targets Ethanolamin spielen. Denkbar ist auch die Verknüpfung beider Aspekte.

Übertragen auf die Basenabfolge der Konsensussequenz der selektierten Aptamere, könnte sich die in Abbildung 6.2 gezeigte Struktur ausgebildet haben. Diese Struktur ist allerdings als rein hypothetisch zu betrachten und stellt nur eine von vielen Möglichkeiten der Ausbildung von Quadruplexen für diese Basenabfolge dar.

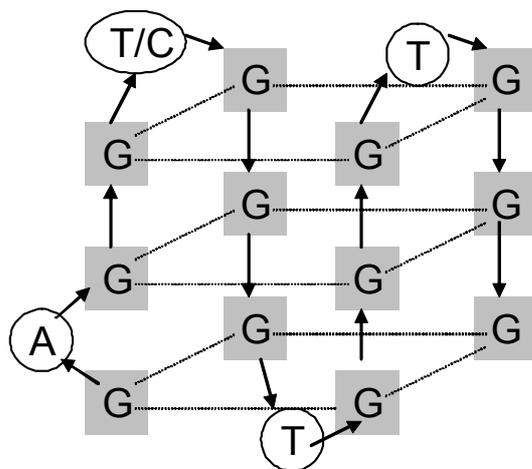


Abb. 6.2: **Hypothetische Quadruplexstruktur der Konsensussequenz**

Schematische Struktur einer möglichen Anordnung der Konsensussequenz ($GAG_2YG_3TG_3TG_3$) als Quadruplexstruktur

6.2.3 Betrachtung der Bindungsversuche

Nach der Sequenzanalyse wurden repräsentative Klone einzelner Sequenzgruppen ausgewählt, um deren Bindungseigenschaften näher zu untersuchen. Dabei wurden sowohl in SELEX SL1 gewonnene und sequenzierte Aptamere der Gruppen I und II, als auch ein Vertreter der Gruppe II des SELEX SP13 (ApPilz #137) in die Untersuchungen einbezogen. Die Bindungsversuche wurden entsprechend den SELEX-Bedingungen mit Ethanolamin-modifizierten Beads durchgeführt. Dazu gehörten qualitativ vergleichende Bindungsversuche, die Aufnahme von Sättigungskurven ausgewählter Aptamere zur Bestimmung der Dissoziationskonstante, sowie Versuche zur Bindung der Aptamere an frei in Lösung vorliegendes Ethanolamin und strukturell verwandten Substanzen. So konnten detaillierte Informationen zur Affinität und Spezifität der individuellen Aptamerklone gewonnen werden.

Bei den qualitativ vergleichenden Bindungsversuchen (siehe Kap. 5.2.3.1) der einzelnen Aptamergruppen wurde die fluoreszenzmarkierte Aptamer-ssDNA an das auf die Beads immobilisierte Ethanolamin gebunden, der Komplex gewaschen und die gebundenen Aptamere durch Hitze eluiert. Anschließend wurde die eluierte ssDNA mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert, wobei davon ausgegangen wurde, dass die gemessene Menge an eluierter, fluoreszenzmarkierter ssDNA der Menge an gebundener ssDNA entspricht (*Wilson & Szostak, 1998; Mendonsa & Bowser, 2004*).

Bei den Versuchen wurde festgestellt, dass alle Aptamere, die das Konsensusmotiv enthielten, Ethanolamin binden konnten. Dies traf für alle Aptamere der Gruppe I und II aus SELEX SL1, sowie für den Vertreter der Gruppe II aus SELEX SP13 (ApPilz #137) zu. Auch für Aptamer #14.5 der Gruppe IV aus SELEX SL1, welches den Konsensusbereich in leicht abgewandelter Form enthielt, wurde eine Bindung an Ethanolamin-modifizierte Beads nachgewiesen. Alle anderen Oligonukleotidgruppen aus SELEX SL1 (Gruppen III, V, VI und VII) zeigten keine Bindungsreaktion mit Ethanolamin. Das weist darauf hin, dass die Guaninhaltige Konsensussequenz für die Bindung an Ethanolamin essentiell ist.

Die Bindungsversuche zur Aufnahme von Sättigungskurven, aus denen die Affinitätskonstanten berechnet wurden, wurden analog zu den oben beschriebenen Versuchen durchgeführt (siehe Kap. 5.2.3.2). Mit der Aufnahme von Sättigungskurven konnte sowohl die Affinität (K_D) der einzelnen Aptamere für Ethanolamin-modifizierte Beads, als auch die Zahl der möglichen Bindungsstellen unter den angewandten Bedingungen (B_{max}) ermittelt werden. Die maximale Anzahl der möglichen Bindungsstellen im Versuch (B_{max}) wird dabei einerseits bestimmt durch die maximale Bindungskapazität der Ethanolamin-Beads, andererseits durch die Bindungseigenschaften des Aptamers.

Die aus der nichtlinearen Regressionsanalyse sowie durch Scatchard-Plots bestimmten K_D -Werte zeigten eine gute Übereinstimmung (mit Ausnahme des ermittelten K_D -Wertes für das Aptamer #11.9 (Gruppe I, SELEX SL1)). Auf diese Weise konnten Affinitätskonstanten der individuellen Aptamere von 2,5–19,0 nM für matrixgebundenes (Magnetic Beads) Ethanolamin unter den angewandten Versuchsbedingungen ermittelt werden. Die relativ großen Unterschiede der errechneten maximalen Anzahl der Bindungsstellen in den Versuchen sind unter anderem auf die Verwendung unterschiedlicher Bead-Chargen zurückzuführen, bei denen unterschiedlich viele Bindungsstellen für Ethanolamin und damit auch für die Aptamere zur Verfügung standen. In vergleichenden Bindungsversuchen der

Aptamere des SELEX SL1, bei denen nur mit einer Bead-Charge gearbeitet wurde (siehe Kap. 5.2.3.1), konnten dennoch erkennbare Tendenzen im Bindevermögen der einzelnen Aptamergruppen herausgearbeitet werden. Auf die Berechnung der K_D -Werte hatte dieser Umstand keine Auswirkungen, da sich der Anstieg der Sättigungskurven nicht in Abhängigkeit zur Bindungskapazität ändert. Die niedrigsten und damit besten Affinitätskonstanten der Aptamere des SELEX SL1 konnten für das Aptamer #14.3 der Gruppe I (~6 nM) und #9.4 der Gruppe II (~10 nM) ermittelt werden. Das Aptamer ApPilz #137 aus SELEX SP13 weist eine noch bessere Bindungsaffinität zu Ethanolamin-Beads mit einem K_D -Wert von ~2,5 nM auf. Tendenziell hatten die Aptamere der Gruppe I die niedrigeren K_D -Werte, zeigten aber ein geringeres Bindungsvermögen. Bei der Aptamergruppe II konnten zwar höhere Werte für das maximale Bindevermögen ermittelt werden, die Sensitivität war aber geringer (K_D -Werte größer). Aptamer ApPilz #137, welches strukturell den Aptameren der Gruppe I ähnlicher ist, als denen der Gruppe II, fügt sich in diese Beobachtungen ein. Der ermittelte K_D -Wert ist sehr klein (~2,5 nM) und das maximale Bindevermögen eher gering.

Vergleicht man die berechneten Affinitätskonstanten mit anderen in der Literatur beschriebenen, stellt man fest, dass die hier vorgestellten Ethanolamin-Aptamere sehr gute K_D -Werte besitzen (siehe Tab. 6.1).

Tab. 6.1: **Vergleich der Affinitätskonstanten unterschiedlicher Aptamere**
Grau unterlegt sind die Angaben der Aptamere, die für kleine Targets generiert wurden.

Aptamer für ...	K_D		Literaturverweis
L-Citrullin	62-68	μM	<i>Klug & Famulok, 1994</i>
Guanosin	32	μM	aus: <i>Wilson & Szostak, 1999</i>
Tryptophan	18	μM	aus: <i>Wilson & Szostak, 1999</i>
ATP	1-10	μM	<i>Huizenga & Szostak, 1994</i>
Cocain	0,4-10	μM	<i>Stojanovic et al., 2000</i>
Cellobiose	0,1-10	μM	<i>Famulok et al., 1999</i>
Arginin	0,3	μM	aus: <i>Wilson & Szostak, 1999</i>
human IgE	30	nM	<i>Mendonsa & Bowser, 2004</i>
Ethanolamin	2,6-19	nM	<i>vorliegende Arbeit</i>
Valin	12	nM	aus: <i>Wilson & Szostak, 1999</i>
Hepatitis C Virus NS3 Protease	10	nM	<i>Sekiya et al., 2002</i>
Human VEGF	49	pM	<i>Brody & Gold, 2000</i>

Anzumerken ist, dass die in dieser Arbeit ermittelten Affinitätskonstanten für auf Magnetic Beads immobilisiertes Ethanolamin bestimmt wurden. In der Literatur finden sich ebenfalls Beispiele, in denen die Affinitätskonstanten für immobilisierte Targets in ähnlichen Verfahren, wie dem hier vorgestellten, ermittelt wurden (*Wilson und Szostak, 1998; Mendonsa & Bowser, 2004*). Um die K_D -Werte der Aptamere für freies Ethanolamin bestimmen zu können, fehlt bisher eine geeignete Nachweismethode, die für ein so kleines

Molekül wie Ethanolamin anwendbar ist. Dennoch sollte in zukünftigen Arbeiten nach einer Möglichkeit gesucht werden, die Affinitätskonstanten der Aptamere für nicht Matrix-assoziiertes Ethanolamin zu bestimmen. Vorstellbar wäre dafür der Bindungsnachweis mit Aptameren, die als Molecular Beacons gestaltet sind. Dabei wird der Mechanismus des „Induced Fit“ im Bindungsmoment ausgenutzt (Williamson, 2000). Die Aptamere werden so konstruiert, dass ein Fluorophor und ein entsprechender Quencher an je einem Ende des Aptamers lokalisiert sind. Trifft das Aptamer auf sein Target, verändert es seine Konformation für eine Bindung dergestalt, dass das Fluoreszenzsignal, je nach Konstruktion, verstärkt oder abgeschwächt wird. Diese Änderung ist im Versuchsansatz konzentrationsabhängig messbar (Tan et al., 2004; Hamaguchi et al., 2001). Es sind auch andere, ähnlich funktionierende Aptamer-Designs möglich. Man spricht dann von Signaling Aptamers. Einige der möglichen Konstruktionen von Signaling Aptamers sind in Abb. 6.3 dargestellt (Nutio & Li, 2004). Für diese Arten des Bindungsnachweises spielt die Targetgröße keine Rolle und daher könnte das Verfahren auch für den Nachweis der Aptamerbindung an freies Ethanolamin geeignet sein.

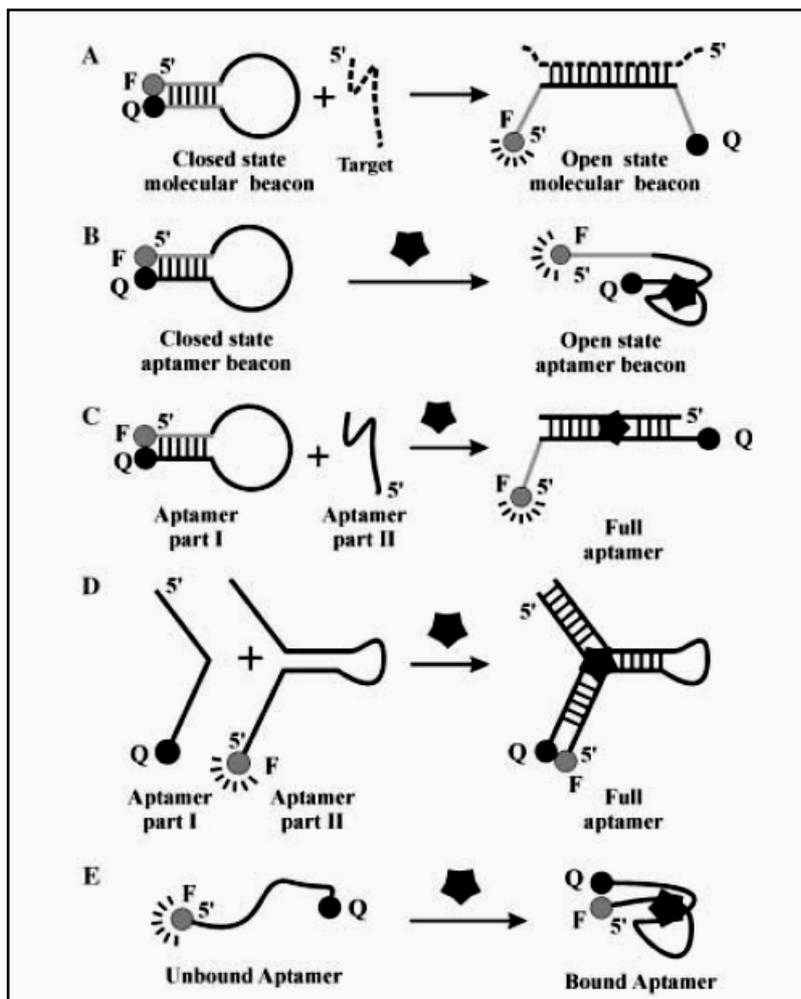


Abb. 6.3: Design und Nachweismechanismen von Molecular Beacons und Signaling Aptamers

A) Standard Molecular Beacon und sein Signalmechanismus

B – E) andere Wege zum Design von Aptamer-Beacons

F bezeichnet das Fluorophor und Q den Quencher. Schwarze Linien oder Kurven repräsentieren Target-bindende Sequenzen, die grauen Linien markieren Nukleotide, die nicht in die Targetbindung einbezogen sind. Nukleinsäure-Targets sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet und Nicht-Nukleinsäure-Targets als schwarze Sterne dargestellt. (Abb. aus: Nutio & Li, 2004)

6.2 Selektion von Aptameren für Ethanolamin

In der hier vorliegenden Studie wurden kompetitive Affinitätselutions-Experimente durchgeführt, um die Bindungsfähigkeit der selektierten Aptamere zu freiem, nicht immobilisiertem Ethanolamin und zu anderen, struktur- und funktionsverwandten Substanzen zu bestimmen (siehe Kap. 5.2.3.3, Abb. 6.4). Dazu wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-gesättigte Magnetic Beads gebunden und anschließend mittels der in ungebundener Form in Lösung vorliegenden Substanzen eluiert. Die Elution durch die jeweilige freie Substanz setzt eine entsprechende Affinität des Aptamers für dieses Reagenz voraus. Mit diesem Verfahren war eine Klärung der Spezifität, ebenso wie eine genauere Bestimmung der für die Aptamerbindung relevanten Targetstrukturen möglich (Wilson und Szostak, 1998).

In die Versuche waren je ein Vertreter der Aptamergruppen I (#14.3) und II (#9.4) des SELEX-Prozesses SL1 und das Aptamer ApPilz #137 aus SELEX SP13 (Gruppe II) einbezogen.

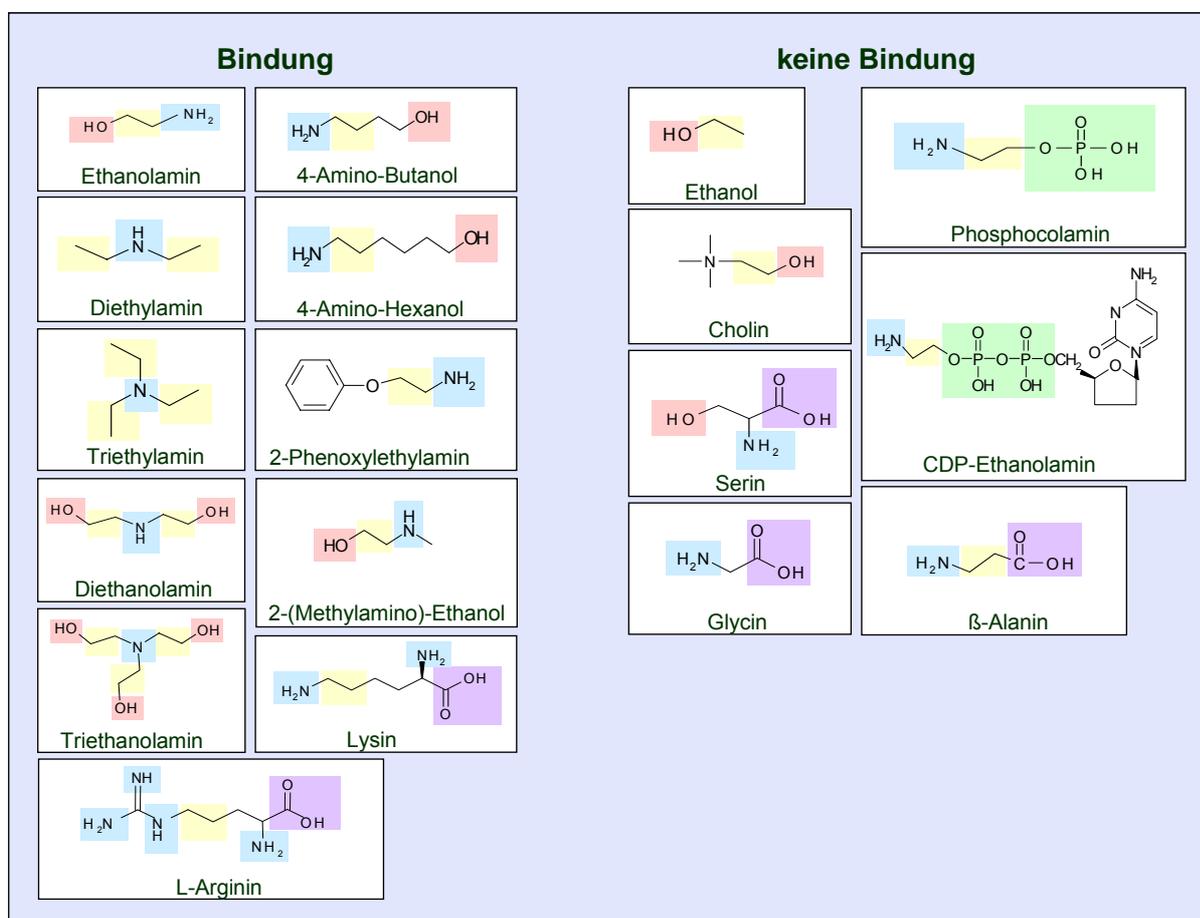


Abb. 6.4: **Bestimmung der Spezifität der Ethanolamin-Aptamere mittels Affinitätselution**

Für die Affinitätselutions-Versuche wurden die Aptamere zunächst an Ethanolamin-Beads gebunden. Anschließend erfolgte die Affinitätselution der Aptamere mit je 10 mM der frei in Lösung vorliegenden Substanzen. Gezeigt sind die Strukturformeln der Substanzen zu denen eine bzw. keine Bindung der Ethanolamin-Aptamere erfolgte. Rot unterlegt sind die Hydroxyl-, blau die Amino-, gelb die Ethyl-, violett die Carboxyl- und grün die Phosphatgruppen.

Zunächst wurde die Affinität der ausgewählten Aptamere zu Ethanolamin und seinen Derivaten, Di- und Triethanolamin, getestet. Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die selektierten Aptamere an freiem Ethanolamin binden. Dieser Nachweis ist von Bedeutung, da es Konformitäts-Unterschiede zwischen dem gebundenen und dem freien Molekül geben kann. Gerade bei einem so kleinen Molekül wie Ethanolamin könnten solche Unterschiede

große Auswirkungen haben und dazu führen, dass das Aptamer das freie Target nicht erkennt. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass zudem eine Bindung der Aptamere an die Ethanolaminderivate stattfand. Diethanolamin wurde sogar in noch höherem Maße gebunden, als das Selektionstarget Ethanolamin. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die größere strukturelle Ähnlichkeit der eigentlichen Target-Bindungsregion zu immobilisiertem Ethanolamin (siehe Abb. 6.4). Während der Selektion dürfte Ethanolamin über die Aminogruppe an den Epoxy-Beads immobilisiert gewesen sein, da durch die gewählten Immobilisierungsbedingungen diese Art der Kopplung favorisiert war. Somit ist die strukturelle Ähnlichkeit der Aminogruppe (als sekundäres Amin vorliegend) im Diethylamin, dem Matrix-assoziierten ähnlicher als dem freien Ethanolamin (als primäres Amin vorliegend). Triethanolamin wurde etwas schlechter erkannt, als die beiden anderen Derivate. Vielleicht ist hierfür, trotz der zur Verfügung stehenden drei Ethanol-Gruppen, eine sterische Behinderung derselben verantwortlich. Dafür sprechen würde auch, dass Aptamer ApPilz #137, welches 20 Nukleotide kleiner ist, Triethanolamin besser binden kann, als die beiden Aptamere #14.3 und #9.4. Es ist anzunehmen, dass es durch seine geringere Größe nicht so stark von dieser Hinderung betroffen ist.

Bei der Testung der Bindungsfähigkeit der Aptamere zu Molekülen, die ähnlich wie Ethanolamin aufgebaut sind, aber über ein „verlängertes“ Kohlenstoff-Grundgerüst verfügen, stellte sich heraus, dass eine Kettenverlängerung keinen Einfluss auf die Bindung hat.

Um herauszufinden, welche der beiden funktionellen Gruppen des Ethanolamins (Hydroxyl- oder Aminogruppe) für die Aptamerbindung relevant ist, wurden Bindungsversuche mit Substanzen durchgeführt, denen entweder die Hydroxyl- oder aber die Aminogruppe fehlen. Die jeweils andere funktionelle Gruppe ist aber im Molekül enthalten. Ethanol wurde ausgewählt, da es keine Aminogruppe enthält, darüber hinaus aber die gleiche chemische Struktur, wie Ethanolamin besitzt. Für die Versuche mit Ethanolamin-ähnlichen Substanzen ohne Hydroxylgruppe wurden Diethylamin und Triethylamin herangezogen. In diesen Experimenten wurde eine sehr gute Bindung der Aptamere an Di- und Triethylamin, jedoch keine an Ethanol festgestellt. Diethylamin wurde in gleichem und Triethylamin sogar in noch höherem Maße gebunden als Ethanolamin. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass für die Bindung offenbar eine Ethylamingruppe essentiell ist, während die Hydroxylgruppe augenscheinlich nicht in die Bindung einbezogen ist. Die nachfolgenden Affinitätselutions-Versuche zu den strukturell ähnlichen Substanzen Methylamino-Ethanol und Phenoxyethylamin untermauerten diese Erkenntnisse, da eine gute Bindungsfähigkeit zu beiden Reagenzien vorlag. Methylamino-Ethanol ist über die Aminogruppe mit einem Methylrest verknüpft, während bei Phenoxyethylamin ein Phenolring über das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe an den Aminoethylrest gebunden ist (siehe Abb. 6.4).

Die Aptamere wurden auch auf ihre Wechselwirkungen zu einzelnen Aminosäuren hin untersucht. Die ausgewählten Aminosäuren Glycin, β -Alanin, Lysin und Arginin sind im weitesten Sinne strukturverwandt mit Ethanolamin. Sie wurden ausgewählt, weil sie kleine einfach aufgebaute Moleküle sind, welche eine kettenförmige Grundstruktur besitzen und keine aromatischen oder heterozyklischen Anteile enthalten. Dabei wurde festgestellt, dass immer dann eine gute Bindungsfähigkeit vorlag, wenn im Molekül mindestens eine Aminogruppe in einer Form existierte, an der die Möglichkeit für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bestand. So konnte keine Bindung an Glycin und β -Alanin nachgewiesen

werden. Hier liegen die im Molekül enthaltenen Aminogruppen in ionisierter Form vor, da sie in Wechselwirkung mit den Carboxylgruppen stehen. Dagegen konnte eine Bindungsfähigkeit der Aptamere zu Arginin und Lysin gezeigt werden. Diese Aminosäuren enthalten zusätzliche Aminogruppen in den Seitenketten, welche für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen (siehe Abb. 6.4).

Besonders wichtig für eine eventuelle spätere praktische Anwendung in einem Messsystem war die Abklärung der Bindungsfähigkeit der selektierten Aptamere zu natürlich vorkommenden Ethanolamin-Verbindungen und zu funktionell ähnlichen Substanzen. Ethanolamin spielt eine wichtige Rolle im Phospholipidstoffwechsel und damit beim Aufbau von biologischen Membranen. In seiner phosphorylierten Form ist es neben Cholin und Serin eine der wichtigsten Kopfgruppenelemente von Phospholipiden (Stryer, 1991) und bildet Phosphatidylethanolamin (Folch, 1941; Birner et al., 2001; Lehninger et al., 1998). Phosphatidylethanolamin wird physiologisch über verschiedene Wege synthetisiert. So besteht einerseits die Möglichkeit der *de novo* Synthese aus CDP-Ethanolamin und Diacylglycerol (Kennedy & Weiss, 1956) und andererseits über Modifikationen bereits existierender Phospholipide durch Decarboxylierung des Phosphatidylserins oder über einen Kopfgruppentausch zwischen Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (Vance, 2002; Vincent et al., 1999; Manoharan et al., 2000).

Wenn Ethanolamin im Körper nicht zu Phosphoethanolamin phosphoryliert werden kann, wie bei der Stoffwechselkrankheit Ethanolaminose, und damit physiologisch nicht verwertbar ist, wird es in Organen und Geweben abgelagert und führt zum Tod der Erkrankten (Viotor et al., 1977).

Auf Grund der engen physiologischen und strukturellen Verwandtschaft, war es wichtig zu überprüfen, ob die selektierten Aptamere in der Lage sind, Cholin und Serin von Ethanolamin zu diskriminieren. Andererseits sollte untersucht werden, ob phosphorylierte Ethanolaminverbindungen erkannt werden.

Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die selektierten Aptamere in der Lage sind, Ethanolamin von Serin und Cholin zu unterscheiden. Es erfolgte weder eine Bindung an Serin noch an Cholin, deren chemische Struktur folgende Gründe für dieses Resultat vermuten lassen: Cholin bietet keine Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen am Stickstoffatom, weil dieses als quartäres Amin vorliegt. Auch bei Serin ist keine Ausbildung einer Wasserstoffbrücke am Stickstoffatom möglich, da die im Molekül enthaltene Aminogruppe ionisiert ist und in Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe steht (siehe Abb. 6.4).

Die getesteten phosphorylierten Verbindungen, Phosphoethanolamin und CDP-Ethanolamin wurden von den selektierten Aptameren nicht erkannt. Wahrscheinlich verhindert die starke negative Ladung der Phosphatgruppen eine Anlagerung des Aptamers an die entsprechende Substanz. Auch in natürlich vorkommenden Nukleinsäure-Target-Systemen sind Moleküle mit negativen Ladungen eher selten an den Kontaktflächen zwischen Nukleinsäure und Target zu finden. So sind an den Moleküloberflächen von RNA-bindenden Peptiden und Proteinen häufig basische Aminosäuren, wie Arginin und Lysin, anzutreffen, die an etwa 60 % der intermolekularen Wasserstoffbrücken in Protein-RNA-Komplexen beteiligt sind (Hermann, 2000). Dennoch gibt es in der Literatur auch Beispiele für erfolgreiche Aptamerbindungen zu phosphorylierten Molekülen, wie zu Nukleotiden (z.B.

DNA-Aptamer für ATP, *Huizenga & Szostak, 1995*; RNA-Aptamer für GTP, *Davis & Szostak, 2002*) oder zu Thiaminpyrophosphat (RNA-Aptamer, *Noeske et al., 2006*). Zum Teil binden diese Aptamere gerade an den Phosphatgruppen (*Sazani et al., 2004; Noeske et al., 2006*). Meist jedoch wird festgestellt, dass die stärksten Interaktionen mit anderen Regionen und nicht mit den Phosphatresten im Target stattfinden (*Oestreich, 2004; Carothers et al., 2006*). In den Arbeiten von *Sazani et al. (Sazani et al., 2004)* wurde deutlich herausgearbeitet, dass sich die Aptamere für die Phosphatgruppen von ATP erst nach einer speziellen Counterselektion durchsetzen konnten. In dieser Counterselektion wurden all die Oligonukleotide aus dem Aptamerpool entfernt, die an andere Domänen des ATP (Adenin, Ribose) banden und die bei vorhergehenden Selektionen immer wieder dominiert hatten.

Die Ergebnisse der Affinitätselutions-Untersuchungen (siehe Kap. 5.2.3.3) sind in kurzer, übersichtlicher Form in Abb. 6.4 zusammengefasst. Im Wesentlichen wurden folgende Charakteristika festgestellt. Für eine Bindung der Aptamere an die Zielmoleküle ist die Hydroxylgruppe nicht notwendig, während das Vorhandensein der Aminogruppe essentiell ist. Diese muss als primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe vorliegen. Moleküle, die ausschließlich quartäre Amine oder Aminogruppen in ionisierter Form enthalten, werden nicht gebunden. Auch phosphorylierte Ethanolamin-Verbindungen werden von den Aptameren nicht erkannt. Aus den ermittelten Resultaten ist zu schlussfolgern, dass wahrscheinlich auch komplexere Moleküle, wie beispielsweise Peptide, Proteine oder Aminosucker, mit einer frei zugänglichen Ethylamingruppe gebunden werden können, wenn keine störenden stark geladenen Gruppen vorliegen.

6.2.4 Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aptamere gewonnen und analysiert, die in der Lage sind, Ethanolamin zu binden. In Bindungsstudien wurde festgestellt, dass die selektierten Aptamere spezifisch für Moleküle mit Ethylamin-haltigen Strukturen sind. Um die Spezifität weiter einzugrenzen, sollten zusätzliche Bindungsversuche mit anderen Molekülen durchgeführt werden. So könnte die Bindungsfähigkeit zu anderen Aminosäuren, z.B. solchen mit aromatischen Seitenketten, getestet werden. Für eine eventuelle Anwendung in der Praxis ist auch die Spezifität der Aptamere für physiologische Peptide und Proteine entscheidend. Zunächst sollte in diesem Zusammenhang die Bindungsaffinität für jene Peptide und Proteine geprüft werden, die Aminosäuren enthalten, die durch die Aptamere erkannt werden (Lysin, Arginin).

Eine weitergehende Aufgabe sollte auch die K_D -Wert-Bestimmung zu freiem Ethanolamin und anderen Substanzen darstellen. Hierfür wäre eine Konfigurierung der Aptamere in Molecular Beacons oder Signaling Aptamers durch Sequenzmodifizierungen denkbar, wodurch homogene Bindungsversuche möglich würden.

In weiterführenden Untersuchungen wurde bereits begonnen, das Bindungsmotiv innerhalb des Aptamers aufzuklären. Dazu werden Versuche mit verkürzten Aptamersequenzen durchgeführt. Vor allem das Konsensusmotiv steht im Mittelpunkt der Betrachtungen. Zusätzlich kann durch Einführung von Punktmutationen geprüft werden, ob die Affinität und Spezifität der Aptamerbindung optimierbar ist.

Interessant wäre die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, die Aptamer und Target während des Bindevorgangs einnehmen. Diese kann durch Röntgenstrukturanalyse oder Kernresonanzspektroskopie ermittelt werden.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Ethanolamin-bindenden Aptamere sind vielfältig. So können mit Hilfe dieser Aptamere Moleküle detektiert werden, die eine frei zugängliche Ethylamin-Gruppe besitzen. Diese Detektionen können *in vitro* erfolgen. Jedoch ist in fernerer Zukunft auch eine Bestimmung im physiologischen Kontext denkbar. Allerdings muss dabei angemerkt werden, dass die Teilstruktur, an die die Aptamere binden (Ethylamin) häufig vorkommt, so dass die Aptamere wahrscheinlich eine Mehrzahl von Zielmolekülen detektieren würden.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Aptamere als „Affinitäts-Tags“ oder als Linker-elemente für die Immobilisierung von Targetmolekülen oder die Isolation interessierender Substanzen aus komplexen Gemischen einzusetzen. Ebenso kann mit Hilfe dieser Aptamere die Belegung von Immobilisierungsmatrizen geprüft werden, deren nicht belegte Bindungsstellen mit Ethanolamin geblockt wurden. Dieser Nachweis erfolgt über indirekte Messungen, wobei der Anteil der matrixgebundenen Ethanolamin-Aptamere Auskunft über die nicht belegten Bindungsstellen gibt.

6.3 Ähnlichkeit von Aptameren aus verschiedenen SELEX-Prozessen

6.3.1 Vergleich von Aptameren aus SELEX SL1 und SP13

Bei der Auswertung der selektierten Aptamersequenzen der oben beschriebenen SELEX-Prozeduren, wurde eine deutliche Ähnlichkeit der Einzelklone der Gruppe I des SELEX SL1 und der Gruppe II des SELEX SP13 offenkundig (siehe Kap. 5.1.2.1). Diese Ähnlichkeit überraschte, da völlig andere Targets in den entsprechenden *in vitro* Selektionen eingesetzt worden waren. SELEX SP13 war für die Selektion spezifischer Aptamere für Bestandteile der löslichen Sporenfraktion von Schimmelpilzen durchgeführt worden (siehe Kap. 5.1.1.3), während im SELEX SL1 die Ethanolamin-Aptamere gewonnen wurden (siehe Kap. 5.2.1). Trotzdem waren die Sequenzen der Kernregionen in einem Bereich von ~36 Nukleotiden nahezu identisch. Auch die identifizierte Konsensus-Sequenz (**GAGGYGGGTGGGTGGG**) der Gruppen I und II des SELEX SL1 konnte in den Aptameren der Gruppe II des SELEX SP13 nachgewiesen werden. Darüber hinaus besaßen die Aptamere unterschiedliche Größen. So waren die Aptamere der Gruppe I des SELEX SL1 ~96 Nukleotide groß, während die der Gruppe II des SELEX SP13 nur ~76 Nukleotide umfassten. Diese Unterschiede entsprechen exakt der Größe der jeweils eingesetzten Ausgangsbibliothek und zeigen damit, dass es sich nicht um eine Kontamination oder Verschleppung einzelner Oligonukleotide von einem zum anderen SELEX-Prozess handelt.

In alle Bindungsversuche zur Bestimmung der Affinität und Spezifität der Ethanolamin-Aptamere aus SELEX SL1, war auch ein Vertreter der Gruppe II des SELEX SP13 mit einbezogen (ApPilz #137). Diese Verfahrensweise wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Aptamere mit gleichen Konsensussequenzen aus unterschiedlichen SELEX-Prozessen gewählt. Aptamer ApPilz #137 zeigte in diesen Versuchen gleiche oder ähnliche Ergebnisse,

wie die in SELEX SL1 selektierten Aptamere (siehe Kap. 5.2.3). Auch der ermittelte K_D -Wert von ApPilz #137 lag mit 2,6 nM zwar etwas niedriger, aber in der gleichen Größenordnung, wie die der anderen untersuchten Aptamere. Wurden geringfügige Unterschiede zwischen beiden Aptamergruppen des SELEX SL1 im Verhalten ausgemacht (K_D -Wert, maximales Bindevormögen), dann fügte sich Aptamer ApPilz #137, welches strukturell den Aptameren der Gruppe I ähnlicher ist, als denen der Gruppe II, in diese Beobachtungen ein. Die Ergebnisse des Aptamers ApPilz #137 waren dann eher mit denen der Gruppe I als denen der Gruppe II vergleichbar.

Die Summe all dieser Ergebnisse deutet darauf hin, dass im SELEX SP13 Aptamere für Ethylamin-spezifische Strukturen selektiert wurden. Es ist also davon auszugehen, dass der als Target verwendete lösliche Sporenextrakt, Bestandteile mit Ethylamin-Strukturen enthielt. Leider gibt es derzeit noch keine umfassenden Erkenntnisse über die Bestandteile von *Penicillium expansum* Sporen, so dass keine vergleichenden Betrachtungen darüber angestellt werden konnten, welche Ethylamin-haltigen Strukturen für diese Selektion verantwortlich zeichnen. Morozova *et al.* (Morozova *et al.*, 2002) finden in Sporen von Schimmelpilzen (*Aspergillus*) Phosphatidyl-Ethanolamin, welches eine Ethylamin-Struktur darstellt. Allerdings wird auf Grund der hier dargestellten Bindungsstudien ausgeschlossen, dass eine Selektion für diese Substanz stattgefunden hat, da die gewonnenen Aptamere nicht in der Lage waren, phosphorylierte Ethanolamin-Strukturen zu erkennen. Eher wahrscheinlich ist eine Selektion für ein Peptid oder Protein, welches frei zugängliches Lysin oder Arginin enthält. Diese Überlegungen sind aber rein spekulativ und bedürfen weiterer experimenteller Nachforschungen.

6.3.2 Vergleich mit Aptameren aus der Literatur

Beim Vergleich der Aptamersequenzen mit in der Literatur beschriebenen (siehe Tab. 6.2), wurden Analogien zu Aptameren, welche die HIV-1-Virus Replikation durch Integrase-Inhibition hemmen, festgestellt (Rando *et al.*, 1995; Jing & Hogan, 1998). Einige dieser beschriebenen Aptamere besitzen eine der hier gefundenen Konsensusregion sehr ähnliche Sequenz. Diese weist ebenfalls eine annähernd vierfache Wiederholung eines Guanin-Triplets auf, getrennt durch je ein Thymin-Nukleotid, und auch das erste Guanin-Triplett ist durch ein „Nicht-Guanin“ unterbrochen. Allerdings handelt es sich im Fall der HIV-1-Integrase-Hemmer dabei um ein Thymin ($GTG_2TG_3TG_3TG_3$) und bei den Ethanolamin-Aptameren um ein Adenin ($GAG_2TG_3TG_3TG_3$). Diese Aptamere (HIV-1-Integrase-Hemmer) wurden jedoch nicht aus einem randomisierten Oligonukleotidpool in einem Selektionsverfahren gewonnen, sondern definiert aus Guanin- und Thymin-Desoxyribonukleotiden synthetisch hergestellt (Rando *et al.*, 1995). In Arbeiten, denen ein SELEX-Prozess zur Gewinnung von Aptameren gegen HIV-1 RNase H zu Grunde lag (Androlea *et al.*, 2001), wurden ebenfalls ähnlich Guanin-reiche Strukturen in den selektierten Aptameren gefunden. Diese ssDNA-Oligonukleotide sind in der Lage, die Aktivität sowohl der RNase H, als auch der Integrase des HIV-1-Virus zu inhibieren (de Soultrait *et al.*, 2002). In verschiedenen Bindungsversuchen, in denen die synthetisch hergestellten HIV-Integrase-Hemmer durch Mutationen gezielt verändert wurden, stellten die Autoren fest, dass die Bindungsinteraktion in einer „face to face“-Reaktion zwischen der katalytischen Domäne der Integrase und einer GTGT-Loop-Region am Ende der „Guanin-Stapel“ des Aptamers stattfindet. Eine

Erweiterung der „Stapelhöhe“ veränderte das Bindeverhalten nämlich nicht (Jing et al., 2000).

Wilson und Szostak (Wilson & Szostak, 1998) isolierten mittels *in vitro* Selektions-Experimenten spezifische Aptamere für das Fluorophor Sulforhodamin B. Mehrere der von ihnen selektierten Aptamere zeigen Regionen, die ebenfalls große Übereinstimmungen zur Konsensussequenz der Ethanolamin-Aptamere aufweisen. Auch hier finden sich vier aufeinander folgende Guanin-Tripletts, die nur durch jeweils ein Nukleotid (Adenin oder Thymin) unterbrochen sind. Bei nachfolgenden Experimenten mit gekürzten und punktmutierten Oligonukleotiden wurde festgestellt, dass die Anordnung der Guanin-Nukleotide dieser Region bindungsentscheidend ist. Wurden z.B. Guanin-Dubletts oder -Quartetts anstelle der -Tripletts eingesetzt, verringerte sich die Bindungsfähigkeit enorm. Nach Austausch einzelner Guanin-Nukleotide durch Nukleotide anderer Basen fand keine Bindung mehr statt. Ebenso wurde eine stark verringerte Bindungsfähigkeit festgestellt, wenn zwischen den einzelnen Guanin-Tripletts nicht nur ein, sondern mehrere Nukleotide anderer Basen eingeschoben wurden. Ein Austausch der zwischen den Guanin-Tripletts liegenden Einzelnukeotide (Adenin ersetzt durch Thymin und umgekehrt) veränderte das Bindeverhalten nicht. Die Spezifität der unmodifizierten Sulforhodamin B-Aptamere (Minimalform) wurde mittels kompetitiver Affinitätselutionsversuche überprüft. Sie binden selektiv an Substanzen, die Strukturen mit drei oder mehr aromatischen Ringen aufweisen.

Tab. 6.2: **Ausgewählte Aptamere mit Sequenzregionen ähnlich dem Konsensusmotiv der Ethanolamin-Aptamere**

Die fett gedruckten **G**'s in den Sequenzen stehen für Guanin-Nukleotide, für die die Autoren eine Beteiligung an G-Quadruplexen vermuten.

Wirkung	Aptamer	Sequenz	Literatur
Erkennung von Strukturen mit Ethylamin	- ssDNA - Gewinnung durch SELEX	Konsensussequenz: 5'- GAGGYGGGTGGGTGGG -3'	diese Arbeit
HIV-1-Integrase-Hemmung	- ssDNA, 3'-modifiziert - definierte Synthese	5'- GTGGTGGGTGGGTGGGT -3' 5'- GGGTGGGTGGGTGGGT -3'	<i>Rando et al., 1995</i> <i>Jing & Hogan, 1998</i>
Hemmung HIV-1-RNase H und HIV-1-Integrase	- ssDNA - Gewinnung durch SELEX	5'- GGGGTGGGAGGAGGGT -3' 5'- CGGGTGGGTGGGTGGT -3'	<i>Androlea et al., 2001</i> <i>de Soultrait et al., 2002</i>
Erkennung von Sulforhodamin B und ähnlichen Strukturen	- ssDNA - Gewinnung durch SELEX	gekürztes Minimal-Aptamer: 5'-ATGACCAA GGGTGGGAGGGAGGGGGT CAT-3'	<i>Wilson und Szostak, 1998</i>

Die Ähnlichkeiten zu anderen in der Literatur gefundenen Guanin-haltigen Aptameren zeigen, dass dieses Sequenzmotiv, bestehend aus vier aufeinander folgenden Guanin-Tripletts mit jeweils einem dazwischen liegenden Nukleotid, ein sich wiederholt durchsetzendes Motiv darstellt. Sowohl in dieser Arbeit als auch in der Beschreibung der Aptamere anderer Arbeiten, wurde trotz dieser Ähnlichkeiten eine deutliche Spezifität der selektierten Aptamere festgestellt. Möglicherweise sind schon geringe Sequenzunterschiede dafür verantwortlich, wie beispielsweise die „Unterbrechung“ eines der Guanin-Tripletts durch ein anderes Nukleotid (z.B. Adenin bei den Ethanolamin-Aptameren, Thymin bei den HIV-1-Integrasehemmern).

6.3.3 Weiterführende Arbeiten und Anwendungspotenzial

Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass im SELEX SP13 Aptamere für Ethylamin-spezifische Strukturen selektiert worden sind. Dieser SELEX-Prozess war auf die Gewinnung von Aptameren ausgerichtet, die Bestandteile von Schimmelpilzen detektieren können. Im löslichen Sporenextrakt der *Penicillium expansum* Sporen, der als Target verwendet wurde, befinden sich also mit großer Wahrscheinlichkeit Moleküle mit Ethylamin-Strukturen, für die eine Aptamerselektion stattgefunden hat. Es wird vermutet, dass es sich dabei um Peptide oder Proteine mit frei zugänglichen Lysin- oder Arginin-Seitenketten handelt. In nachfolgenden Arbeiten sollte geklärt werden, welche Sporenbestandteile von Aptamer ApPilz #137 erkannt werden. Dazu könnte eine Affinitätsaufreinigung, wie in Kap. 4.8.4 und 5.1.3.3 beschrieben, auch mit diesem Aptamer durchgeführt und die dabei eventuell separierten Proteine mit Hilfe von Massenspektrometrie und anderen Proteinanalyseverfahren genauer charakterisiert werden. Die Untersuchungen können auch dazu dienen, weitere Erkenntnisse über die einzelnen Bestandteile von Schimmelpilzsporen zu gewinnen.

Darüber hinaus kann die bekannte Sequenz des Aptamers auch bei anderen SELEX-Prozessen für komplexe Targets hilfreich sein. So wird die Identifikation der Aptamerbindenden Bestandteile erleichtert, wenn bekannt ist, welche Aptamersequenzen für entsprechende Targetstrukturen selektiert werden. Eine erfolgte Anreicherung von Oligonukleotiden mit der oben beschriebenen Konsensussequenz stellt also ein Indiz für das Vorhandensein von frei zugänglichen Ethylamin-haltigen Strukturen im Target dar. Im Umkehrschluss besteht auch die Möglichkeit, die Ethanolamin-modifizierten Beads für Negativselektionen einzusetzen, wenn eine Aptameranreicherung für bekannte, im Target enthaltene Ethylamin-Strukturen unerwünscht ist.

Zusätzlich könnten Sequenzmodifikationen, Kernresonanzspektroskopie-Studien und Röntgenstrukturanalysen Aufschluss darüber geben, in welcher dreidimensionalen Struktur das Aptamer vorliegt und welcher Bereich des Aptamers für die Bindung verantwortlich ist.

7 Zusammenfassung

Biosensoren sind moderne Messsysteme, mit denen Analyten ohne zusätzliche Reaktions-schritte zur Probenaufbereitung durch Biorezeptoren erkannt werden. Die Selektivität wird dabei maßgebend von den eingesetzten Biorezeptoren bestimmt. Am Markt etabliert haben sich bisher vor allem Sensoren auf Basis von Enzymen und Antikörpern. Zu den neueren Entwicklungen von biologischen Rezeptoren in Biosensoren gehören auch Aptamere. Diese kurzen einzelsträngigen Nukleinsäure-Oligomere können ein Target mit hoher Affinität und Spezifität binden, indem sie passgenau für das Zielmolekül eine bestimmte dreidimensionale Struktur einnehmen. Die Gewinnung von Aptameren erfolgt in einer speziell an das Target angepassten *in vitro* Selektionsprozedur, dem so genannten SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Dieser Kreisprozess zielt darauf ab, aus einer randomisierten Oligonukleotidbibliothek schrittweise für das Target spezifische und affine Nukleinsäuremoleküle anzureichern.

In der vorliegenden Arbeit wurden auf diesem Wege einerseits Aptamere generiert, die in der Lage sind, Bestandteile eines sehr komplexen Targets (Schimmelpilzsporen) zu binden und andererseits solche, die ein äußerst einfach strukturiertes Molekül (Ethanolamin) detektieren können.

Schimmelpilze stellen neben Milben die wichtigsten Innenraumallergene dar. In zahlreichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen respiratorischen Symptomen bzw. Allergien und dem Vorkommen von Feuchtigkeit und Schimmelbefall festgestellt. Bisher etablierte Nachweismethoden für einen Schimmelpilzbefall sind meist sehr zeit-, personal- und kostenintensiv. So wird derzeit nach schnelleren und einfach zu standardisierenden Nachweismöglichkeiten gesucht. Aptamere, in Biosensoren eingesetzt, bieten diese Möglichkeit. Mit dieser Arbeit wurde bereits ein wesentlicher Beitrag dazu geleistet.

Durch Einsatz des FluMag-SELEX-Verfahrens konnte eine Selektion von Konidienbestandteil-bindenden Aptameren, unter Verwendung des löslichen Extraktes von *Penicillium expansum* Sporen als Target, erreicht werden. Die ssDNA-Moleküle der eingesetzten Oligonukleotidbibliothek hatten eine Länge von 76 Nukleotiden, von denen ein Bereich von 40 Nukleotiden randomisiert war. Der angereicherte Aptamerpool der achten Runde des SELEX-Prozesses war in der Lage, Bestandteile von *Penicillium expansum* Sporen zu erkennen. Ein Kontrollversuch mit der löslichen Sporenfraktion von *Penicillium brevicompactum* zeigte nur eine 50 %ige Erkennung. Der angereicherte Aptamerpool enthielt also sowohl Oligonukleotide für speziescharakterisierende, als auch für unspezifische oder artenübergreifende Bestandteile der Sporen. Die Sequenzierung von 37 Aptamerklonen aus dem selektierten Pool ergab, dass eine signifikante Anreicherung einiger weniger Aptamere erfolgt war. Diese ließen sich in Sequenzvergleichen in neun Gruppen einordnen. Ein einheitliches Konsensusmotiv trat nicht auf. In nachfolgenden Bindungsversuchen zur Charakterisierung der einzelnen Aptamerklone konnte für drei Klone eine eindeutige Bindung zu einzelnen Sporenproteinen nachgewiesen werden. Um welche Proteine es sich dabei handelt, muss in weitergehenden Analysen geklärt werden.

Für einen anderen selektierten Aptamerklon wurde eine definierte Bindung zu Ethylamin-Strukturen aufgezeigt. Es wird vermutet, dass es sich bei den erkannten Zielmolekülen um Proteine mit freien Lysin- oder Arginin-Seitenketten handelt.

Weiterführende Arbeiten können dazu beitragen, mit Hilfe der Aptamere genauere Kenntnisse über Bestandteile von Schimmelpilzsporen und deren Eigenschaften zu gewinnen. Zudem können die selektierten Aptamere nach umfassenderer Analyse zum Nachweis von Schimmelpilzbefall mit Biosensoren eingesetzt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden Aptamere für das sehr kleine und einfach strukturierte Target Ethanolamin selektiert, welches eine biologische, medizinische und industrielle Relevanz besitzt. So spielt Ethanolamin als eines der wichtigsten Kopfgruppenelemente von Phospholipiden eine bedeutende Rolle beim Aufbau von biologischen Membranen. Es ist involviert in die Biosynthese von Acetylcholin und wird mit einigen neurodegenerativen Krankheiten und der Stoffwechselstörung Ethanolaminose in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wird es in der Industrie und der Forschung vielfältig genutzt. Ethanolamin ist das kleinste organische Molekül, für das bisher ein Aptamer selektiert wurde. Die Selektion wurde mit Hilfe der Methode des FluMag-SELEX realisiert. Nach zehn Runden des Prozesses, bei dem eine 96mer Ausgangsbibliothek zum Einsatz kam, wurde eine Anreicherung für Ethanolamin-bindende Oligonukleotide festgestellt. Der angereicherte Aptamerpool wies eine beträchtliche Homologie auf. Nahezu 90 % der sequenzierten Oligonukleotide konnten zwei Aptamergruppen zugeordnet werden. Beide Gruppen enthielten einen 16-basigen, besonders Guanin-haltigen Konsensusbereich (GAG₂YG₃TG₃TG₃). Die Affinitätskonstanten der einzelnen Aptamerklone, bestimmt für immobilisiertes Ethanolamin, lagen im nanomolaren Bereich (6–19 nM). Mit Hilfe von kompetitiven Affinitätselutionsversuchen wurden die Bindungsfähigkeit der Aptamere zu freiem Ethanolamin, die Spezifität und die Bindungsregion des Targets ermittelt. So wurde festgestellt, dass die selektierten Oligonukleotide spezifisch an Ethylamin-Strukturen im Target binden. Im Unterschied zur Hydroxylgruppe des Ethanolamins war die Aminogruppe für die Aptamerbindung essentiell. Diese musste als primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe vorliegen, damit eine Bindung erfolgte. Moleküle, die ausschließlich quartäre Amine oder Aminogruppen in ionisierter Form enthielten, wurden nicht gebunden. Auch phosphorylierte Ethanolamin-Verbindungen wurden von den Aptameren nicht erkannt.

Die isolierten Ethanolamin-Aptamere können vielfältig eingesetzt werden, z.B. zur Detektion von Molekülen mit Ethylamin-haltigen Strukturen, als Linkerelemente für die Immobilisierung und Isolierung von Targetmolekülen, sowie zur Belegungsprüfung von Immobilisierungsmatrizes, wenn die Absättigung freier Bindungsstellen der Matrix mit Ethanolamin erfolgt ist.

Ein im SELEX-Prozess für Schimmelpilzbestandteile gewonnenes Aptamer zeigte eine ähnliche Struktur und gleiche Bindungseigenschaften, wie die Ethanolamin-Aptamere. Auch hier wurde der Guanin-haltige Konsensusbereich gefunden. Im Vergleich mit strukturähnlichen Aptameren aus der Literatur, wurde aufgezeigt, dass das Konsensusmotiv, bestehend aus vier aufeinander folgenden Guanin-Triplets mit jeweils einem dazwischen liegenden Nukleotid, zwar ein sich wiederholt durchsetzendes Motiv darstellt, die Spezifitäten dieser ähnlichen Aptamere jedoch sehr unterschiedlich sein können. Begründet sind diese Differenzen wahrscheinlich schon in geringen Sequenzunterschieden.

8 Literaturverzeichnis

- Aguilar, G. & Huitrón, C.** (1993) Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus* sp. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 127-132.
- Androlea, M.-L., Pileur, F., Calmels, C., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Toulmé, J.-J. & Litvak, S.** (2001) DNA aptamers selected against the HIV-1 RNase H display *in vitro* antiviral activity. *Biochem* **40**, 10087-10094.
- Akkoyun, A.** (2002) Detection of low molecular weight molecules by using optical biosensors. *Dissertation*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig, Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Axelsson, B.-O., Saraf, A. & Larsson, L.** (1995) Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromat B* **666**, 77-84.
- Baek, I.-G.** (1999) Analytik von Aminosäuren und biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC und GC. *Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Ernährungs- und Haushaltwissenschaften.
- Barreto-Bergter, E., Gorin, P.A. & Travassos, L.R.** (1981) Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydr Res* **95**, 205-218.
- Beijer, L., Thorn, J. & Rylander, R.** (2003) Mould exposure at home relates to inflammatory markers in blood. *Eur Resp J* **21**, 317-322.
- Bernard, M. & Latge, J.P.** (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: Composition and biosynthesis. *Med Mycol* **39**, 9-17.
- Bicknese, S., Periasamy, N., Shohet, S.B. & Verkman, A.S.** (1993) Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry. *Biophys J* **65**, 1272-1282.
- Birner, R., Bürgermeister, M., Schneiter, R. & Daum, G.** (2001) Roles of Phosphatidylethanolamine and its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**, 997-1007.
- Blank, M.** (2002) Systematische Evolution von DNA-Aptameren zur Charakterisierung und Diagnostik von pathologisch veränderten Endothelzellen in Tumoren und entzündlichen Regionen des Rattenhirns. *Dissertation*, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M. & Schluesener, H.** (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: selective targeting of endothelial regulatory protein p19. *J Biol Chem* **276**, 11464-11468.
- Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A. Vermaas, E.H. & Toole, J.J.** (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564-566.
- Böck, R.** (2001) Sensorische Wirkungen von flüchtigen Metaboliten (MVOC) in verschimmelten Innenräumen. *Umweltmed Forsch Prax* **6**, 137-143.
- Borgia, P.T. & Dodge, C.L.** (1992) characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J Bacteriol* **174**, 377-383.
- Bornehag, C.G., Blomquist, G., Gyntelberg, F., Järholm, B., Malmberg, P., Nordvall, L., Nielsen, A., Pershagen, G. & Sundell, J.** (2001) Dampness in Buildings and Health. Nordic

- Interdisciplinary Review of the Scientific Evidence on Associations between Exposure to “Dampness” in Buildings and Health Effects (NORDDAMP). In: *Indoor Air* **11**, Dänemark 72-86.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brody, E.N. & Gold L.** (2000) Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Rev Mol Biotechnol* **74**, 5-13.
- Bruno, J.G. & Kiel, J.L.** (1999) In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens Bioelectron* **14**, 457-454.
- Bruno, J.G.** (1997) In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbeads based affinity separation and fluorescence detection. *Biochem Biophys Res Comm* **234**, 117-120.
- Bukle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D. & Lowe, C.R.** (1993) The resonant mirror: a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions; Part II: Applications. *Biosens Bioelectron* **8**, 355-363.
- Burgstaller, P. & Famulok, M.** (1994) Isolation of RNA-Aptamers for biological cofactors by *in vitro* selection. *Angew Chem Int Edit* **33**, 1084-1087.
- Burke, D.H. & Willis, J.H.** (1998) Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through Chimeric SELEX. *RNA* **4**, 1165-1175.
- Burkhart, B.** (2006) Untersuchungen zu den strukturchemischen Ursachen von Primärem Gushing. *Dissertation*, Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.
- Cao, L., Chan, C.-M., Lee, C., Wong, S.S.-Y. & Yuen, K-Y.** (1998) MP1 encodes an abundant and high antigenic cell wall mannoprotein in the pathogenic fungus *Penicillium marneffeii*. *Infect Immun* **66**, 966-973.
- Carothers, J.M., Davis, J.H., Chou, J.J. & Szostak, J.W.** (2006) Solution structure of an informationally complex high-affinity RNA aptamer to GTP. *RNA* **12**, 567-579.
- Cass, A.E.** (1990) Biosensors: A Practical Approach. Pergamon, Oxford.
- Cerchia, L., Duconge, F., Pestourie, C., Boulay, J., Aissouni, Y., Gombert, K., Tavitian, B., de Franciscis, V. & Libri D.** (2005) Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol* **3**, e123.
- Chew, G.L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K.M., van Strien, R., Spithoeven, J. & Brunekreef, B.** (2001) Fungal extracellular polysaccharides, β -(1,3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* **11**, 171-178.
- Clark, S.L. & Remcho, V.T.** (2002) Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis* **23**, 1335-1340.
- Cole, L., Hawes, C. & Dewey, F.M.** (1991) Immunocytochemical localization of a specific antigen in cell walls of *Penicillium islandicum*. *Mycol Res* **95**, 1369-1374.
- Connor, A.C. & McGown, L.B.** (2006) Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography. *J Chromat A* **1111**, 115-119.
- Conrad, R. & Ellington, A.D.** (1996) Detecting immobilized protein kinase C isozymes with RNA aptamers. *Anal Biochem* **242**, 261-265.

- Crameri, A. & Stemmer, W.P.C.** (1993) 10^{20} -fold aptamer library amplification without gel purification. *Nucleic Acid Res* **21**, 4410.
- Crooke, S.T.** (1992) Oligonucleotide therapy. *Curr Opin Biotech* **3**, 656-661.
- Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J. & Goddard, N.J.** (1993) The resonant mirror: a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions; Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosens Bioelectron* **8**, 347-353.
- Dang, C. & Jayasena, S.D.** (1996) Oligonucleotide inhibitors of *Taq* DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J Mol Biol* **264**, 268-278.
- Daniels, D.A., Chen, H., Hicke, H.B., Swiderek, K.M. & Gold, L.** (2003) A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 15416-15421.
- Davis, J.H. & Szostak, J.W.** (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc Natl Sci USA* **99**, 11616-11621.
- Davis, J.T.** (2004) 40 Jahre G-Quartetts: von 5'-GMP zur Molekularbiologie und Supramolekularen Chemie. *Angew Chem* **116**, 684-716.
- Davis, K.A., Lin, Y., Abrams, B. & Jayasena, S.D.** (1998) Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acid Res* **26**, 3915-3924.
- Deacon, J. W.** (1997) *Modern Mycology* (3rd Edition). Blachwill Science Ltd., Oxford, London.
- Deng, Q., German, I., Buchanan, D. & Kennedy, R.T.** (2001) Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal Chem* **73**, 5415-5421.
- deSoultrait, V.R., Lozach, P-Y., Altmeyer, R., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S. & Androlea, M.L.** (2002) DNA aptamers derived from HIV-1 RNase inhibitors are strong anti-integrase agents. *J Mol Biol* **324**, 195-203.
- Dickert, F.L., Lieberzeit, P. & Tortschanoff, M.** (2000) Molecular imprints as artificial antibodies – a new generation of chemical sensors. *Sensor Actuator B* **65**, 186-189.
- Dill, I.** (1998): Schimmelpilze in Innenräumen – Leistungsfähigkeit der Nachweismethoden. In: Gebäudestandard 2000: Energie & Raumluftqualität, Ergebnisse des 4. Fachkongresses der Arbeitsgemeinschaft Ökologischer Forschungsinstitute (AGÖF) am 25. und 26.09.1998 in Nürnberg. 248-252.
- Douwes, J., Doekes, G., Montijn, R., Heederick, D. & Brunekreef, B.** (1996) Measurement of β -(1-3)-glucans in occupational and home environments with inhibition enzyme immunoassay. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3176-3182.
- Drolet, D.W., Moon-McDermot, L. & Romig, T.S.** (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol* **14**, 1021-1025.
- Eaton, B.E., Gold, L., Hicke, B.J., Janjié, N., Jucker, F.M., Sebesta, D.P., Tarasow, T.M., Willis, M.C. & Zichi, D.A.** (1997) Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. *Bioorg Med Chem* **5**, 1087-1096.
- Ebersbach, H.** (2004) Neuartige Bindemoleküle für die Diagnostik auf der Grundlage eines Strukturproteins. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät.

- Edel, V.** (1998) Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: Bridge, P.D. (Ed.) Applications of PCR in mycology. University Press, Cambridge, 1-20.
- Ellington, A.D. & Szostak, J.W.** (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822.
- Engelhardt, S., Loock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H. & Exner, M.** (2002) Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3886-3890.
- Ensele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C., Bowden, R., Burik van, J.-A., Engelhard, D., Kanz, L. & Schumacher, U.** (1997) Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* **June 1997**, 1353-1360.
- Famulok, M. & Mayer, G.** (1999) Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol* **243**, 123-136.
- Famulok, M.** (1994) Molecular recognition of amino acids by RNA-aptamers – an L-citrulline binding RNA motif and its evolution into an L-arginine binder. *J Am Chem Soc* **116**, 1698-1706.
- Famulok, M.** (2005) Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches. *Curr Opin Mol Ther* **7**, 137-143.
- Farooqui, A.A., Rapoport, S.I. & Horrocks, L.A.** (1997) Membrane phospholipids alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamin plasmalogens. *Neurochem Res* **22**, 523-527.
- Fickert, H., Fransson, I.G. & Hahn, U.** (2006) Aptamers to small molecules. In: Klussmann, S. (Ed.), The Aptamer Handbook. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 95-115.
- Fischer, G., Müller, T., Schwalbe, R., Ostrowski, R. & Dott, W.** (2000) Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi arrived from biowaste. *Int J Hyg Environ Health* **203**, 105-116.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R. & Dott, W.** (1999) Species-specific production of Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* **39**, 795-810.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Ostrowski, R. & Dott, W.** (1998) Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility. *Mycoses* **41**, 383-388.
- Fitzgerald, K.** (2000) *In vitro* display technologies: new tools for drug discovery. *Drug Discov Today* **5**, 253-258.
- Flannigan, B. & Miller, J.D.** (1994) Health implications of fungi in indoor environments – an overview. In: Samson, R.A., Flannigan, G., Flannigan, E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G.K. & Hoekstra, E.S. (Eds.), Health implications of fungi in indoor environments. Air Quality Monographs Vol.2, Elsevier Amsterdam, 3-28.
- Flannigan, B., McCabe, E.M. & McGary, F.** (1991) Allergenic and toxigenic microorganisms in houses. *J Appl Bacteriol* **70**, 61-73.
- Fleischmann, S.** (2003) Ursachen, begünstigende Faktoren, Auswirkungen und Prophylaxe von Feuchtigkeit und Schimmelpilzbildung in Wohnräumen. *Dissertation*, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Medizinische Fakultät.
- Folch, J.** (1941) Brain cephalin, a mixture of phosphatides. Separation from it of phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine and a fraction containing an inositol phosphatide. *J Biol Chem* **146**, 35-44.

- Fuhrmann, B., Lebreton, V., van Hoegaerden, M., Kamphuis, H.J. & Strosberg, A.D.** (1992) A monoclonal antibody specific for conidia and Mycelium wall layer of *Penicillium* and *Aspergillus*. *Microbiol Immunol* **36**, 1-12.
- Fukusaki, E.-I., Kato, T., Maeda, H., Kawazoe, N., Ito, Y., Okazawa, A., Kajiyama, S.-I. & Kobayashi, A.** (2000) DNA aptamers that bind to chitin. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 423-525.
- Gaillard, C. & Strauss, F.** (1990) Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acid Res* **18**, 378.
- Gassen, G.H. & Schimpf, G.** (1999) Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- German, I., Buchanan, D. & Kennedy, R.T.** (1998) Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis. *Anal Chem* **70**, 4540-4545.
- Giardin, H., Paris, S., Rault, J., Bellon-Fontaine, M.-N. & Latgé, J.-P.** (1999) The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Lett Appl Microbiol* **29**, 364-369.
- Gilbert, D.E. & Feigon, J.** (1999) Multistranded DNA-Structures. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 305-314.
- Giver, L., Bartel, D.P., Zapp, M.L., Green, M.R. & Ellington, A.D.** (1993) Selection and design of high-affinity RNA ligands for HIV-1 Rev. *Gene* **137**, 19-24.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. & Yarus, M.** (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* **64**, 763-797.
- Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C. & Koch, T.H.** (2000) Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. *J Biotechnol* **81**, 167-178.
- Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. & Janjic, M.** (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor. *Chem Biol* **2**, 683-695.
- Hamaguchi, N., Ellington, A. & Stanton, M.** (2001) Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal Biochem* **294**, 126-131.
- Hamann, C.H., Hamnett, A. & Vielstich, W.** (1998) Electrochemistry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Hamm, J.** (1996) Characterisation of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries. *Nucl Acid Res* **24**, 2220-2227.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R. & Plückthun, A.** (1998) Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14130-14135.
- Harada, K. & Frankel, A.D.** (1995) Identification of two novel arginine binding DNA's. *Embo J* **14**, 5798-5811.
- Hassur, S.M. & Whitlock, H.W., Jr.** (1974) UV-Shadowing – a new and convenient method for the location of ultraviolet-absorbing species in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **59**, 162-164.
- Hermann, T.** (2000) Strategien für die Entwicklung gegen RNA und RNA-Protein-Komplexe gerichteter pharmakologischer Wirkstoffe. *Angew Chem* **112**, 1962-1979.

- Hermann, T. & Patel, D.J.** (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**, 820-825.
- Herr, C. & Harpel, S.** (2001) MVOC – ein relevantes gesundheitliches Problem für die Bevölkerung. *Umweltmed Forsch Prax* **6**, 125-126.
- Ho, M.Y. & Rechnitz, G.A.** (1987) Highly stable biosensor using an artificial enzyme. *Anal Chem* **59**, 536-537.
- Hofmann, H.P., Limmer, S., Homung, V. & Sprinzi, M.** (1997) Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA* **3**, 1289-1300.
- Homann, M. & Goringer, H.U.** (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acid Res* **27**, 2006-2014.
- Horner, W.E., Helbig, A., Salvaggio, J.E. & Lehrer, S.B.** (1995) Fungal Allergens. *Clin Microbiol Rev* **8**, 161-179.
- Hudson, P.J.** (1999) Recombinant antibody fragments. *Curr Opin Biotech* **9**, 395-402.
- Huizenga, D.E. & Szostak, J.W.** (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **34**, 656-665.
- Hussmann, E.** (1968) Nachreaktionen in röntgenbestrahlten wässrigen Lysinlösungen und anderen aliphatischen Aminosäurelösungen. *Biophysik* **5**, 132-144.
- Iwamoto, M., Yoshioka, T., Nitta, K. & Ito, K.** (1998) Glomerular endothelial injury associated with free radical production induced by a fungal cell wall component, (1→3) beta-D glucan. *Life Sci* **62**, 247-255.
- James, W.** (2000) Aptamers. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 4848–4871.
- Janeway, C.A.** (1993) Das molekulare Arsenal des Immunsystems. *Spektrum der Wissenschaft Spezial* **2**, 28-35.
- Jayasena, S.D.** (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* **45**, 1628-1650.
- Jellinek, D., Lynott, C.K., Rifkin, D.B. & Janjicacute, N.** (1993) High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11227-11231.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. & Polisky, B.** (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425-1429.
- Jeong, S., Eom, T.Y., Kim, S.J., Lee, S.W. & Yu, J.** (2001) In vitro selection of the RNA aptamer against the Sialyl Lewis X and its inhibition of the cell adhesion. *Biochem Biophys Res Comm* **281**, 237-243.
- Jing, H. & Hogan, M. E.** (1998) Structure-activity of tetradforming oligonucleotides as a potential anti-HIV therapeutic drug. *J Biol Chem* **273**, 34992-34999.
- Jing, N., Marchand, C. Liu, J., Mitra, R., Hogan, M.E. & Pommier, Y.** (2000) Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides *in vitro*. *J Biol Chem* **275**, 21460-21467.

- Johanning, E.** (1998) Allergene und giftige Schimmelpilze in Innenräumen. Ökologisches Bauen und Sanieren, Ergebnisse des Kongresses der Arbeitsgemeinschaft Ökologischer Forschungsinstitute (AGÖF) und des Allergie-Vereins in Europa e.V. (AVE), 154-163.
- Jones, A.P.** (1999) Indoor air quality and health. *Atmos Environ* **22**, 4535-4564.
- Kamphuis, H.J.** (1992) Extracellular polysaccharides as target compounds for the immunological detection of *Aspergillus* and *Penicillium* in food. *Dissertation, WAU Dissertation No. 1536*, University of Wageningen.
- Kawakami, J., Kawase, Y. & Sugimoto, N.** (1998) In vitro selection of aptamers that recognize a monosaccharide. *Anal Chim Acta* **365**, 95-100.
- Kawazoe, N., Ito, Y., & Imanishi, Y.** (1996) Patterned staining by fluorescein-labeled oligonucleotides obtained by in vitro selection. *Anal Chem* **68**, 4309-4311.
- Keller, R., Sönnichsen, R. & Ohgke, H.** (1998) Untersuchung der flüchtigen organischen Stoffwechselprodukte von ausgewählten Schimmelpilzen (*Penicillium expansum*, *Aspergillus versicolor*) mittels GC-MSD zur Erkennung von nicht sichtbarem Schimmelpilzbefall in Innenräumen. In: Ökologisches Bauen und Sanieren, Ergebnisse des Kongresses der Arbeitsgemeinschaft Ökologischer Forschungsinstitute (AGÖF) und des Allergie-Vereins in Europa e.V. (AVE), 181-191.
- Kennedy, E.P. & Weiss, S.B.** (1956) The function of cytidin coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* **222**, 193-214.
- Kershaw, M.J. & Talbot, N.J.** (1998) Hydrophobines and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fung Genet Biol* **23**, 18-33.
- Kingston, D.G.I., Chen, P.N. & Vercellotti, J.R.** (1976) High performance liquid chromatography of sterigmatocystin and other metabolites of *Aspergillus versicolor*. *J Chromat* **118**, 414-417.
- Kirsten, H.** (2001) Aptamere als neuartige Rezeptoren zur Detektion von Schimmelpilzsporen: Schritte zur Aptamergewinnung am Beispiel von *Aspergillus versicolor* und *Penicillium expansum*. *Diplomarbeit*, Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie.
- Kleinjung, F., Klusmann, S., Erdmann, V.A., Scheller, F.W., Fürste, J.P. & Bier, F.F.** (1998) High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor. *Anal Chem* **70**, 328-331.
- Klug, S.J. & Famulok, M.** (1994) All you want to know about SELEX. *Mol Biol Res* **20**, 97-107.
- Klug, S.J., Huttenhofer, A. & Famulok, M.** (1999) In vitro selection of RNA aptamers that bind special elongation factor SelB, a protein with multiple RNA-binding sites, reveals one major interaction domain at the carboxyl terminus. *RNA* **5**, 1180-1190.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A. & Fürste J.P.** (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotech* **14**, 1112-1115.
- Kotia, R.B., Li, L. & McGown, L.B.** (2000) Separation of nontarget compounds by DNA aptamers. *Anal Chem* **72**, 827-831.
- Kreisel, H.** (1988) Zur Bestimmung des Begriffes "Schimmelpilze". *ZBL Mikrobiol* **143**, 263-267.
- Kurtz, M.B. & Douglas, C.M.** (1997) Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* **35**, 79-86.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lee, M. & Walt, D.R.** (2000) A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem* **282**, 142-146.
- Lehmann, I., Rehwagen, M., Diez, U., Seiffart, A., Rolle-Kampczyk, U., Richter, M., Wetzig, H., Borte, M. & Herbarth, O.** (2001) Enhanced *in vivo* IgE production and T cell polarization toward the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *Int J Hyg Environ Health* **204**, 211-221.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M.** (1998) *Prinzipien der Biochemie*. 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Leva, S., Lichte, A., Burmeister, J., Muhn, P., Jahnke, B., Fesser, D., Erfurth, J., Burgstaller, P. & Klussmann, S.** (2002) GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: aptamer novel approach toward GnRH antagonism. *Chem Biol* **9**, 351-359.
- Li, S., Marquardt, R.R. & Abramson, D.** (2000) Immunochemical detection of moulds: a review. *J Food Protect* **63**, 281-291.
- Li, Y. & Breaker, R.P.** (1999) Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 315-323.
- Lin, Y. & Jayasena, S.D.** (1997) Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. *J Mol Biol* **271**, 100-111.
- Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feinster, B. & Jayasena, S.D.** (1996) High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by *in vitro*-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acid Res* **24**, 3407-3414.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. & Prohaska, E.** (2002) an aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem* **74**, 4488-4495.
- Lu, Y.** (2002) New transition-metal-dependent DNAzymes as efficient endonucleases and as selective metal biosensors. *Chemistry* **8**, 4589-4596.
- Lukassowitz, I.** (1990) Bedeutung von Pilzinfektionen nicht unterschätzen. *Bundesgesundheitsblatt* **9**, 374.
- Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A. & Feigon, J.** (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3745-3749.
- Maes, W.** (1999) *Schimmelpilze, deren Sporen, Gifte und Gase. Elektrosmog – Wohngifte – Pilze. Baubiologie – praktische Hilfe für jedermann.* Haug-Verlag, 267-271.
- Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B.** (2005) *In vitro* selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Comm* **338**, 1928-1934.
- Manoharan, K., Chae, H.S., Cha, J.M., Cho, S.H., Shin, S.H., Cho, B.H. & Lee, W.S.** (2000) Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant Cell Physiol* **41**, 1143-1148.
- Marhall, M., Gull, K. & Jeffries, P.** (1997) Monoclonal antibodies as probes for fungal wall structure during morphogenesis. *Microbiology* **143**, 2255-2265.
- Mendonsa S. D. & Bowser M. T.** (2004) *In vitro* selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 5387-5392.

- Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A. Ravel, A., Grosset, C. & Peyrin, E.** (2003) A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc* **125**, 8672-8679.
- Miller, J.D. & Young, J.C.** (1997) The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air. *Am Ind Hyg Ass J* **58**, 39-43.
- Milton, D.K., Alwis, K.U., Fiset, L. & Mulenberg, M.** (2001) Enzyme-linked immunoabsorbent assay specific for (1→6) branched, (1→3)-β-D-glucan detection in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5420 - 5424.
- Missailidis, S., Thomaidou, D., Borbas, K.E. & Price, M.R.** (2005) Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immun Meth* **296**, 45-62.
- Moore, T.S.** (1975) Phosphatidylserine synthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol* **57**, 177-180.
- Moreno, M., Rincón, E., Piñero, D., Fernández, G., Domingo, A., Jiménez-Ruís, A., Salinas, M. & González, V.M.** (2003) Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process. *Biochem Bioph Res Co* **308**, 314-218.
- Moriske, H.J.** (2001) Mikrobielle Verunreinigungen in Innenräumen. Zusammenfassung der Ergebnisse der 8. WaBoLu-Innenraumtage vom 21. bis 23. Mai 2001 im Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* **44**, 924-928.
- Morozova, E.V., Kozlov, V.P., Tereshina, V.M., Memorskaya, A.S. & Feofilova, E.P.** (2002) Changes in lipid composition and carbohydrate composition of *Aspergillus niger* conidia during germination. *Appl Biochem Microbiol* **38**, 149-154.
- Mrklas, O., Chu, A. & Lunn, S.** (2003) Determination of ethanolamine, ethylene glycol and triethylene glycol by ion chromatography for laboratory and field biodegradation studies. *J Environ Monit* **5**, 336-340.
- Müller, U.F. & Göringer, H.U.** (2002) Mechanism of the gBP21-mediated RNA/RNA annealing reaction: matchmaking and charge reduction. *Nucl Acid Res* **30**, 447-455.
- Müller, A. & Herbarth, O.** (1999) Toxic effects of extracts from spores of moulds. *Umweltmed Forsch Prax* **4**, 225.
- Müller, A., Lehmann, I., Seiffart, A., Diez, U., Wetzig, H., Borte, M. & Herbarth, O.** (2002) Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases due to mould exposure: results of the Leipzig Allergy Risk children Study (LARS). *Int J Hyg Environ Health* **204**, 363-365.
- Müller, H.J.** (2001) PCR-Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- Murthy, G.S. & Moudgal, N.R.** (1986) Use of epoxysepharose for protein immobilisation. *J Bioscience* **10**, 351-358.
- Noeske, J, Richter, C., Stirnal, E., Schwalbe, H. & Wohnert, J.** (2006) Phosphate-group recognition by aptamer domaine of thiamine pyrophosphate sensing riboswitch. *Chembiochem* **7**, 1451-1456.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A.** (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* **15**, 772-777.

- Notermans, S. & Soentoro, P.S.S.** (1986) Immunological relationship of extracellular polysaccharide antigen produced by different mould species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**, 393-401.
- Notermans, S., Veeneman, G.H., van Zuylen, C.W.E.M., Hoogerhout, P. & van Boom, J.H.** (1988) (1,5)-linked- β -D-galaktofuranosides are immunodominant extracellular polysaccharides of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mol Immunol* **25**, 975-979.
- Nutio, R. & Li, Y.** (2004) Structure-switching signaling aptamers: transducing molecular recognition into fluorescence signaling. *Chem Eur J* **10**, 1868-1876.
- O'Sullivan, C.K.** (2002) Aptasensors – the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem* **372**, 44-48.
- O'Sullivan, C.K., Vaughan, R. & Guilbaut, G.G.** (1999) Piezoelectric immunosensors – theory and applications. *Anal Lett* **32**, 2353-2377.
- Oestreich, S.** (2004) Binding mechanisms of RNA aptamers. *Dissertation*, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie.
- Okazawa A., Maeda H., Fukusaki E., Katakura Y. & Kobayashi A.** (2000) *In vitro* selection of hematoporphyrin binding DNA aptamers. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 2653-2656.
- Oláh, A., Papp, Z. & Szentirmai, A.** (1993) Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium chrysogenum* strains. *Acta Microbiol Hungaria* **40**, 379-386.
- Osborne, S.E., Matsumura, I. & Ellington, A.D.** (1997) Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. *Curr Opin Chem Biol* **1**, 5-9.
- Ostrowski, R.** (1999) Exposure assessment of moulds in indoor environments in relation to chronic respiratory diseases. *Dissertation*, RWTH Aachen, Shaker Verlag Aachen.
- Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Wills, J.W., Golovine, S. & Wang, J.F.** (1995) Isolation of virus-neutralizing RNA's from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 11509-11513.
- Pasanen, A.** (2001): A Review: Fungal Exposure Assessment in Indoor Environments. *Indoor Air* **11**, Dänemark, 87-98.
- Pasanen, P., Korpi, A., Kalliokoski, P. & Pasanen, A.-L.** (1997) Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. *Environ Int* **23**, 425-432.
- Peet, M., Brind, J., Ramchand, C.N., Shah, S. & Vankar, G.K.** (2000) two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of Schizophrenia. *Schizophrenia Res* **49**, 243-251.
- Pfeifer, P. & Radler, F.** (1992) Determination of ethanolamine in wine by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonylchloride. *Am J Enol Vitic* **43**, 315-317.
- Pitten, F.A.** (1999) Schimmelpilze im Innenraum. *Umweltmed Forsch Prax* **4**, 253- 255.
- Potts, S.J., Thompson, J.F. & Slaughter, D.C.** (2001) The effect of fungal species on the fluorescent lectin test. *J Microbiol Meth* **46**, 187-191.
- Potyrailo, R.A., Conrad, R.C., Ellington, A.D. & Hieftje, G.M.** (1998) Adapting nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal Chem* **70**, 3419-3425.

- Proske, D.** (2001) Neuropeptid Y- und Prionprotein-spezifische Aptamere: Selektion, Charakterisierung und biologische Funktion. *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Rajendran, M. & Ellington, A.D.** (2002) Selecting nucleic acids for biosensor application. *Comb Chem High T Scr* **5**, 263-270.
- Ramanathan, K. & Danielsson, B.** (2001) Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens Bioelectron* **16**, 417-423.
- Rando, R.F., Ojwang, J., Elbaggari, A., Reyes, G.R., Tinder, R., McGrath, M.S. & Hogan, M.E.** (1995) Suppression of human immunodeficiency virus typ 1 activity *in vitro* by oligonucleotides which form intramolecular tetrads. *J Biol Chem* **4**, 1754-1760.
- Reiß, J.** (1998) Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. (2.Auflage). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Rezler, E.M., Bearss, D.J. & Hurley, L.H.** (2002) Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 415-423.
- Ribbert, M.** (2004) Herstellung von Antikörpern gegen *Venturia inaequalis* zur Entwicklung von Biosensoren. *Dissertation*, Westfälische Technische Universität Aachen, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften.
- Safarik, I. & Safarikova, M.** (2004) Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Res Technol* **2**, 7.
- Sagunski, H.** (1997) Mikrobielle flüchtige organische Verbindungen: Expositionsindikatoren bei Schimmelpilzbefall in Innenräumen? *Umweltmed Forsch Prax* **2**, 95-100.
- Sambrook, J. & Russel, D.W.** (2001) Molecular Cloning, a Laboratory Manual. (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampson, T.** (2003) Protecting intellectual property rights in SELEX and aptamers. *World Patent Inform* **25**, 343-349.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and O. Filtenborg** (1995) Introduction in food borne fungi (4th Edition). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Saran, D., Frank, J. & Burke, D.H.** (2003) The tyranny of adenosine recognition among RNA aptamers to coenzyme A. *BMC Evol Biol* **3**, 26.
- Sazani, P.L., Larralde, R. & Szostak, J.W.** (2004) A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J Am Chem Soc* **126**, 8370-8371.
- Scheller, F.W. & Schubert, F.** (1989) Biosensoren. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz.
- Schmidt, H.-L., Kittsteiner-Eberle, R.** (1986) Biosensoren. *Naturwissenschaften* **73**, 314-321.
- Schmitz, U., Versmold, A., Kaufmann, P. und Frank, H.** (2000) Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies – a review. *Placenta* **21**, 106-112.
- Schöning, M. J., Schütz, S., Schroth, P., Weißbecker, B., Steffen, A., Kordos, P., Lüth, H. & Hummel, H. E.** (1998) A BioFET on the basis of intact insect antennae. *Sensor Actuat B* **47**, 234-237.

- Schrodt, J.** (1997) Baubiologische und bauphysikalische Aspekte zum Auftreten von Schimmelpilzen sowie Sanierungsmaßnahmen. In: Biogene Luftschadstoffe in Wohn- und Aufenthaltsräumen, *Schriftenreihe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck*, 11-83.
- Sekiya S., Nishikawa F., Fukuda K. & Nishikawa S.** (2002) Structure/function analysis of an RNA aptamer for Hepatitis C Virus NS3 Protease. *J Biochem* **133**, 351-359.
- Senkpiel, K. & Ohgke, H.** (2001) Wohnhygienische Bewertung der mikrobiellen Belastung in feuchten Gebäuden (III-4.4.4). Handbuch für Bioklima und Lufthygiene – 5. Erg. Lfg. 4, 1-23.
- Senkpiel, K.** (1997): Biogene Belastung im Innenraum unter besonderer Berücksichtigung der Bestimmungsmethoden und der mikrobiellen Wachstumsfaktoren. In: Biogene Luftschadstoffe in Wohn- und Aufenthaltsräumen. *Schriftenreihe des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck*, 85-113.
- Shafer, R.H. & Smirnov, I.** (2001) Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes. *Biopolymers* **56**, 209-227.
- Shephard, G.S. & Leggott, N.L.** (2000) Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *J Chromat A* **882**, 17-22.
- Simonsson T.** (2001) G-Quadruplex DNA structures – variations on a theme. *Biol Chem* **382**, 621-628.
- Smith, D., Kirschenheuter, G.P., Charlton, J., Guidot, D.M. & Repine, J.E.** (1995) *In vitro* selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase. *Chem Biol* **2**, 741-750.
- Soukup, G.A. & Breaker, R.R.** (2000) Allosteric nucleic acid catalysts. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 318-325.
- Srisawat, C., Goldstein, I.J. & Engelke, D.R.** (2001) Sephadex-binding RNA ligands: rapid affinity purification of RNA from complex RNA mixtures. *Nucleic Acid Res* **29**, E4.
- Stojanovic M. N., de Prada P. & Landry D. W.** (2000) Aptamer-based folding sensor for cocaine. *J Am Chem Soc* **123**, 4928-4931.
- Stoltenburg, R. & Strehlitz, B.** (2003) Entwicklung von Aptameren für Biosensoren. *UFZ-Bericht Nr. 13/2003*, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum / Department Umweltbiotechnologie.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B.** (2005) The FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* **383**, 83-91.
- Stryer, L.** (1991) Biochemie. 3.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York.
- Tahiri-Alaoui, A., Frigotto, L., Manville, N., Ibrahim, J., Romby, P. & James, W.** (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucl Acid Res* **30**, e45.
- Tan, W., Wang, K. & Drake, T.J.** (2004) Molecular beacons. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 1-7.
- Tereshko, V., Skripkin, E. & Patel, D. J.** (2003) Encapsulating streptomycin within a small 40-mer RNA. *Chem Biol* **10**, 175-187

- Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. & Wilson, G.S.** (1999) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Pure Appl Chem* **71**, 2333-2348.
- Thiel, K.** (2004) Oligo-oligarchy – the surprisingly small world of aptamers. *Nat Biotechnol* **22**, 649-651.
- Tombelli, S., Minunni, M. & Mascini, M.** (2005) Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron* **20**, 2424-2434.
- Tronchin, G., Bouchara, J.P., Ferron, M., Larcher, G. & Chabasse, D.** (1995) Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination and rearrangement of the cell wall. *Can J Microbiol* **41**, 714-721.
- Tronchin, G., Esnault, K., Renier, G., Filmon, R., Chabasse, D. & Bouchara, J.P.** (1997) Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* **65**, 9-15.
- Tsai, D.E., Kenan, D.J. & Keene, J.D.** (1992) In vitro selection of an RNA epitope immunologically cross-reactive with a peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8864-8869.
- Tucker, C.E., Chen, L.S., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Gill, S.C. & Drolet, D.W.** (1999) Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **732**, 203-212.
- Tuerk, C. & Gold, L.** (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 polymerase. *Science* **249**, 505-510.
- Vance, D.E.** (2002) Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Vance, D.E. & Vance, J.E., eds., Elsevier Science B.V., 205-232.
- Verhoeff, A.P., van Wijnen, J.H., Hoekstra, E.S., Samson, R.A., van Strien, R.T. & Brunekreef, B.** (1994) Fungal propagules in house dust: relation with home characteristics. In: Samson, R.A., Flannigan, G., Flannigan, E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G.K. & Hoekstra, E.S. (Eds.), Health implications of fungi in indoor environments. Air Quality Monographs Vol.2, Elsevier Amsterdam.
- Viotor, K.W., Havsteen, B., Harms, D., Busse, H. & Heyne, K.** (1977) Ethanolaminosis: a newly recognized, generalized storage disease with cardiomegaly, cerebral dysfunction and early death. *Eur J Pediatr* **126**, 61-75.
- Vincent, P., Maneta-Peyret, L., Sturbois-Balcerzak, B., Duvert, M., Cassagne, C. & Moreau, P.** (1999) One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. *FEBS Lett* **464**, 80-84.
- Wallis, M.G., von Ahsen, U., Schroeder, R. & Famulok, M.** (1995) A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol* **2**, 543-552.
- Wang, Y. & Rando, R.R.** (1995) Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol* **2**, 281-290.
- Wasylnka, J.A., Simmer, M.I. & Moore, M.M.** (2001) Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology* **147**, 869-877.
- Weiss, G.A. & Lowmann, H.B.** (2000) Anticalines versus antibodies: made-to-order binding proteins for small molecules. *Chem Biol* **7**, R177-R184.
- Wessels, J.G.H.** (1999) Fungi in their own right. *Fung Genet Biol* **27**, 134-145.

- Williams, K.P., Liu, X.H., Schumacher, T.N., Lin, H.Y., Ausiello, D.A., Kim, P.S. & Bartel, D.P.** (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11285-11290.
- Williamson, J.R.** (2000) Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat Struct Biol* **7**, 834-837.
- Wilson, G.S.** (1987) in: Biosensors. Fundamentals and Applications. Ed. Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo, 1987.
- Wilson, C. & Szostak, J.W.** (1998) Isolation of fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. *Chem Biol* **5**, 609-617.
- Wilson D. S. & Szostak, J.W.** (1999) In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem*, **68**, 611-647.
- Wösten, H.A.B. & de Vocht, M.L.** (2000) Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta* **1469**, 79-86.
- Yang, Q., Goldstein, I.J., Mei, H.Y. & Engelke, D.R.** (1998) DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5462-5467.
- Xu, W. & Ellington, A.D.** (1996) Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7475-7480.
- Zue, H., Suter, J.D., White, I.M. & Fan, X.** (2006) Aptamer Based Microsphere Biosensor for Thrombin Detection. *Biosens* **6**, 785-795.
- Zuker, M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acid Res* **31**, 3406-3415.

Eigene Arbeiten

Teile der vorliegenden Arbeit sind Bestandteil folgender Veröffentlichungen und wissenschaftlichen Präsentationen.

Zeitschriftenpublikationen:

Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. (2005) The FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* **38**, 83-91.

Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B. (2005) *In vitro* selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Comm* **338**, 1928-1934.

Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. (2006) DNA aptamer selection using a ligand evolution process. *Am Biotechnol Lab* **24**, 18-20.

Patentanmeldung:

Reinemann, C., Mann, D., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B. (2005) Ethylaminspezifische Aptamere, deren Verwendung und ein Kit umfassend diese Aptamere. *Deutsches Patentamt*, angemeldet am 27.10.05, AZ 10 2005 052 275.0.

Beiträge auf Kongressen / Symposien:

Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B. (2004) *In vitro* selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Poster* zur Tagung 5th caesarium. *Advances in Biomedicine*. 6.-8.9.2004, Bonn.

Reinemann, C. (2004) The SELEX process as a model of selecting aptamers applied in biosensors. *Vortrag* zum PhD Students Harz Retreat 2004, 12.-14.11.2004, Clausthal-Zellerfeld.

Reinemann, C., Stoltenburg, R., Mann, D. & Strehlitz, B. (2005) Aptamere für Biosensoren in der Umweltanalytik und medizinischen Diagnostik. *Vortrag* zum 4. Deutschen BioSensor Symposium 2005, 13.-16.03.2005, Regensburg.

Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B. (2005) Aptamers binding ethanolamine. *Poster* zum 4. Biotechnologie-Tag an der Universität Leipzig, 03.06.2005, Leipzig.

Stoltenburg, R., Reinemann, C., Nikolaus, N. & Strehlitz, B. (2006) DNA-aptamer selection by FluMag-SELEX. *Vortrag* zum 9. Biosensor-Weltkongress Biosensors 2006, 10.-12.05.2006, Toronto, Kanada.

Reinemann, C., Stoltenburg, R., Nikolaus, N. & Strehlitz, B. (2006) DNA-aptamer with specificity for the ethylamine group. *Poster* zum 9. Biosensor-Weltkongress Biosensors 2006, 10.-12.05.2006, Toronto, Kanada.

Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. (2006) Development and application of DNA aptamers. *Vortrag* zum Symposium ChemoChips 2006, 15.-16.11.2006, Weimar.

Erklärung

Die Promotionsordnung der Fakultät der Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig ist mir bekannt. Diese Arbeit wurde entsprechend den darin enthaltenen Forderungen und Anforderungen erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Zur Durchführung der Arbeit und zur Erstellung der Dissertationsschrift wurden nur die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich zuvor weder mit dieser oder mit einer anderen Arbeit erfolglose Promotionsversuche unternommen habe. Diese Arbeit wurde zuvor an keiner anderen Hochschule oder Universität des In- und Auslandes als Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Kurzform: Dr. rer. nat.) vorgelegt oder anderweitig publiziert.

Christine Reinemann

Leipzig, der 09. Januar 2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger danke ich herzlich für die gewährte Unterstützung, die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung und die hilfreichen Ratschläge bei der Erarbeitung der Dissertationsschrift.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Stottmeister möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Dr. B. Strehlitz für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit unter solch guten Bedingungen durchführen zu können, die äußerst gute und herzliche Betreuung und das Vertrauen in mich, auch in Zeiten, in denen es schien, als würde nichts mehr gehen.

Bei der Arbeitsgruppe Biosensorik möchte ich ganz besonders bedanken: für das sehr gute Arbeits- und auch das menschliche Klima, in dem ich ich selbst sein und über mich hinaus wachsen konnte, für die Unterstützung, die Aufmunterung und den freundlichen Zuspruch. Besonders Frau Dr. R. Stoltenburg, die mir mit ihrer immerwährenden Geduld jederzeit helfend zur Seite stand, möchte ich danken.

Für die Mitarbeit an Teilen dieser Arbeit möchte ich mich vor allem bei Frau D. Mann und den Praktikanten A. Schuster, J. Liebeskind und S. Schütz herzlich bedanken.

Herrn Dr. R. A. Müller gebührt mein Dank für die Bereitstellung der organisatorischen und exzellenten technischen Voraussetzungen für die Durchführung der Experimente am Umwelt- und Biotechnologischen Zentrum.

Frau Dr. A. Müller und Frau J. Kobelt vom Department Expositionsforschung / Epidemiologie danke ich für die Anzucht und das Bereitstellen der Schimmelpilzsporen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. D. Benndorf und Frau C. Schumann vom Department Proteomik, die mir bei den proteinbiochemischen Analysen im Rahmen der Affinitätsreinigungversuche behilflich waren.

Für das kritische Lesen des Manuskriptes bedanke ich mich bei Frau Dr. B. Strehlitz, Frau Dr. R. Stoltenburg, Frau Dr. N. Nikolaus und meinen Eltern H. und R. Otto.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und all meinen Freunden danken, die mich immer unterstützen und mir Mut machen, meinen Weg zu gehen. Besonders erwähnen möchte ich meine Schwester V. Otto und meine beiden besten Freunde W. Günther und B. Beerbaum, ohne die ich die letzten Monate vielleicht nicht durchgehalten hätte.

Besonders liebevoller Dank gilt meinen beiden Kindern, die mich so oft entbehren müssen. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Reinemann, geb. Otto
Geburtstag: 21. Mai 1966 in Leipzig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: geschieden
Kinder: Felix (geb. 1990); Lara Emilia (geb. 1999)

Ausbildung

1972 – 1982 Polytechnische Oberschule „Rosa Luxemburg“, Leipzig
Abschluss: 10. Klasse, Note sehr gut

1982 – 1984 Ausbildung zur Biologielaborantin an der Universität Leipzig
Abschluss: Facharbeiterin, Note mit Auszeichnung

1985 – 1986 Ingenieurhochschule „Frederic Julius Curie“, Köthen
Abschluss: Fachabitur, Note sehr gut

1986 – 1992 Studium an der Technischen Hochschule Köthen
Fachrichtung: Biotechnologie
Abschluss: Diplomingenieurin, Note gut

1991 – 1992 Diplomarbeit an der Technischen Hochschule Köthen zum Thema:
„Versuche zur Elastase-Reinigung mittels Affinitätschromatographie“,
Prädikat des Diploms: sehr gut

1994 – 1996 Berufsbegleitende Weiterbildung an der Humboldt-Universität, Berlin
Fachrichtung: Umweltwissenschaften / Umweltschutz
Abschluss: Zertifikat, Note sehr gut

Beruflicher Werdegang

1984 – 1985 Biologielaborantin im Bereich Histochemie der Universität Leipzig,
Bearbeitung des Themas: „Der Einfluss unterschiedlicher Inkubations-
bedingungen auf die Darstellbarkeit der multiplen Formen der Acetyl-
cholinesterase am Mikrogel“

1992 – 1994 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich Enzymologie des Max-
Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin GmbH, Berlin zum Thema:
„Charakterisierung und Isolierung einzelner Isoformen des Enzym-
komplexes P450“

1994 – 1996 Umweltingenieurin im Förderverein ÖKOSTADT e.V., Berlin
Leitung des Projektes: „Abfallwirtschaft im Krankenhaus“

1998 – 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Mikrobiologie der Humboldt-
Universität, Berlin im Rahmen des DFG-Projektes: „Biogenese
periplasmatischer Nitratreduktasen“

2002 – 2007 Doktorandin am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,
Thema der Dissertation: „Aptamere als neue molekulare Erkennungs-
elemente in Biosensoren“

