



Selektion von DNA-Aptameren für CD24 und andere medizinisch relevante Oberflächenproteine

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Joanna Aleksandra Fafińska, M.Sc.

geboren am 25.02.1986 Grudziądz/ Polen

Hamburg, im Juli 2019

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2014 bis Dezember 2017 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften) der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Hahn
2. Prof. Dr. Sascha Rohn

Datum der Disputation: 18.10.2019

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

J. Fafińska, A. Czech, T. Sitz, Z. Ignatova and U. Hahn, DNA Aptamers for the Malignant Transformation Marker CD24, *Nucleic Acid Therapeutics*, **28**, 326-334 (2018), doi: 10.1089/nat.2018.0748.

Für Alle die mich auf diesem Weg begleitet haben!

**"Live as if you'll die tomorrow.
Learn as if you were to live
forever."**

Gandhi Mahatma

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	X
ABSTRACT	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 APTAMERE	1
1.1.1 <i>Aptamere vs. Antikörper</i>	2
1.1.2 <i>Zell-SELEX</i>	4
1.2 SELEKTION VON APTAMEREN	5
1.2.1 <i>Hochdurchsatzsequenzierung zur Identifizierung möglicher Aptamere nach SELEX</i>	8
1.3 APTAMERE FÜR KOMPLEXE TARGETS	10
1.3.1 <i>Zelloberflächenproteine als Targets für Aptamere</i>	10
1.3.2 <i>Derivatisierung von Aptameren</i>	21
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
3 MATERIALIEN	27
3.1 ZELLINIEN	27
3.2 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN	27
3.3 PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN	28
3.4 CHEMIKALIEN.....	32
3.5 LÄNGENSTANDARDS	33
3.6 OLIGONUKLEOTIDE.....	34
3.7 KOMMERZIELLE KITS UND SÄULEN	36
3.8 PROTEINE UND MAGNETISCHE <i>BEADS</i>	36
3.9 ENZYME.....	37

INHALTSVERZEICHNIS

3.10	ANTIKÖRPER.....	37
3.11	SOFTWARES.....	38
3.12	GERÄTE.....	39
4	METHODEN.....	40
4.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
4.1.1	<i>Kultivierung von adhärenenten Krebszelllinien</i>	<i>40</i>
4.1.2	<i>Passagieren von Zellen</i>	<i>40</i>
4.1.3	<i>Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer</i>	<i>40</i>
4.1.4	<i>Kryokonservierung von Zellen</i>	<i>41</i>
4.1.5	<i>Mykoplasmen-Kontaminationstest</i>	<i>41</i>
4.1.6	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	<i>42</i>
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	43
4.2.1	<i>Präparationen und Modifikationen der Nukleinsäuren.....</i>	<i>43</i>
4.2.2	<i>Analytische Trennung und Reinigung der Nukleinsäuren.....</i>	<i>51</i>
4.2.3	<i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren</i>	<i>54</i>
4.2.4	<i>Klonierungstechniken</i>	<i>56</i>
4.2.5	<i>Übertragung des genetischen Materials in die Bakterien-Zellen</i>	<i>58</i>
4.2.6	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli-Zellen.....</i>	<i>61</i>
4.2.7	<i>Sequenzierungsmethoden</i>	<i>61</i>
4.3	ALLGEMEINE METHODEN ZUR PROTEINANALYSE.....	63
4.3.1	<i>Biotinylierung</i>	<i>63</i>
4.3.2	<i>Dialyse</i>	<i>63</i>
4.3.3	<i>Dot-Blot</i>	<i>64</i>
4.3.4	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	<i>64</i>

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.5	<i>Coomassie Färbung</i>	65
4.3.6	<i>Immobilisierung von Proteinen auf magnetischen Beads</i>	65
4.4	<i>IN VITRO SELEKTION VON DNA-APTAMEREN</i>	68
4.4.1	<i>Zell-SELEX</i>	70
4.4.2	<i>Click-SELEX</i>	71
4.4.3	<i>Konventionelle SELEX</i>	73
4.5	<i>CHARAKTERISIERUNG DER APTAMERE</i>	74
4.5.1	<i>Stabilitätsassay der Aptamere</i>	74
4.5.2	<i>Sekundärstrukturvorhersage selektierter Oligonukleotide</i>	74
4.5.3	<i>Tertiärstrukturvorhersage selektierter DNA Aptamere</i>	74
4.5.4	<i>CD-spektroskopische Analyse der Struktur von CD24A_2</i>	74
4.5.5	<i>Studien zur Internalisierung von CD24A_2 durch HT-29-Zellen</i>	75
4.5.6	<i>Aptamer-Antikörper-Kompetitionsstudie</i>	75
4.5.7	<i>Bindungsstudien</i>	76
5	ERGEBNISSE	78
5.1	<i>ALLGEMEINE VORGEHENSWEISE</i>	78
5.2	<i>SELEKTION VON DNA-APTAMEREN MIT AFFINITÄT FÜR DAS CD24-MOLEKÜL</i>	80
5.3	<i>CHARAKTERISIERUNG DER CD24-SPEZIFISCHEN APTAMERE</i>	91
5.4	<i>SELEKTION VON APTAMEREN FÜR CD54 (ICAM-1)</i>	101
5.5	<i>SELEKTION VON APTAMEREN FÜR DAS EMBP MOLEKÜL</i>	106
5.6	<i>NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)</i>	114
5.6.1	<i>DNA-Moleküle die in verschiedenen Runden wiederholt auftraten</i>	122
6	DISKUSSION	126
6.1	<i>SELEKTION VON APTAMEREN FÜR DAS CD24-MOLEKÜL</i>	128

INHALTSVERZEICHNIS

6.1.1	<i>Klonierung und Sequenzierung des HT-29 affinen SELEX-Pools</i>	135
6.1.2	<i>Bindungsstudien der Oligonukleotide aus der SELEX für CD24</i>	137
6.2	CHARAKTERISIERUNG DER APTAMERE FÜR CD24	139
6.2.1	<i>Selektion von Aptameren für das CD54-Molekül</i>	144
6.2.2	<i>Selektion von Aptameren für Embp Molekül</i>	147
6.3	HOCHDURCHSATZ-SEQUENZIERUNG ALS SELEX-WERKZEUG	152
7	AUSBLICK	156
8	SICHERHEIT	160
8.1	ENTSORGUNG	160
8.2	KMR-STOFFE	160
8.3	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN GEFÄHRSTOFFE NACH GHS	161
9	LITERATUR	164
10	DANKSAGUNG	179
11	ERKLÄRUNG	182
12	ANHANG	I
12.1	SELEX-METHODEN	I
12.1.1	<i>Aptamer-Selektion für das CD24-Molekül</i>	I
12.1.2	<i>Selektion von Aptameren für CD54 (ICAM-1)</i>	VIII
12.1.3	<i>Selektion von Aptameren für das Embp170-Molekül</i>	X
12.1.4	<i>Selektion von Aptameren für das Embp125-Molekül</i>	XII
12.2	SEQUENZIERUNG NACH SANGER	XIII
12.2.1	CD24	XIII
12.2.2	ICAM-1	XIV
12.2.3	Embp125	XV
12.2.4	Embp170	XVI

INHALTSVERZEICHNIS

12.3	ANALYSE DER DNA-POOLS.....	XVIII
12.3.1	<i>CD24</i>	XVIII
12.3.2	<i>CD54 (ICAM-1)</i>	XXI
12.3.3	<i>Embp125</i>	XXIII
12.3.4	<i>Embp170</i>	XXIV
12.4	VEKTOR-KARTEN	XXXI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

ΔG	Gibbsche Energie (hier wie in der Mfold-Software in kcal/mol)
1°/ 2°	Primär/ Sekundär
2/ 3D	Zwei bzw. Dreidimensional
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration (<i>Concentration</i>)
C	Komplementär (<i>Complementary</i>)
C	Cytosin
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CD11a	α -Untereinheit des LFA-1 Moleküls
CD18	β -Untereinheit des LFA-1 Moleküls
CD24	<i>Cluster of differentiation 24</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CD54	<i>Cluster of differentiation 54</i> (ICAM-1)
Cryo-EM	<i>Cryogenic electron microscopy</i>
C-SELEX	<i>Complementary-SELEX</i>
CuAAC	Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition
Cy5	Cyaninfarbstoff (Abs. 647 nm)
D	Domäne (eine Proteindomäne)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DB	<i>Dissociation Buffer</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	Reinstwasser (Milli-Q)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

denat.	Denaturierend
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
Embp	Extrazelluläres Matrix-bindendes Protein
Et	Ethylgruppe
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIVAR	<i>Found In Various Architectures</i> (Gefunden in verschiedenen Architekturen)
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
fw	<i>Forward</i>
G	Guanin
GA	G-Protein ähnlich
GQ	G-Quadruplex
HSA	<i>Heat stable antigen</i> (murines CD24)
HTS	Hochdurchsatzsequenzierung
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> (Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1)
IDA	Integrinspezifisches DNA-Aptamer
Ig	Immunoglobulin (Antikörper)
IgSF	<i>Immunoglobulin superfamily</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

K	Lysin
K_d	Dissoziationskonstante
kd	<i>Knockdown</i>
Konz.	Konzentration
lat.	Lateinisch
LB	Luria Bertani
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
M	Molare Masse
Min.	Minuten
N	Asparagin
NaOAc	Natriumacetat
nat.	Nativ
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (nächste Generation der DNA-Sequenzierungstechnologie)
N-SELEX	Normale- (konventionelle) SELEX
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
Phos	Phosphat
PI	Propidiumiodid
PWO	<i>Pyrococcus woesei</i> (Bakterium)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
R	Arginin
R	Runde (hier SELEX-Runde)
rev	<i>Reversed</i>
RNA	Ribonukleinsäure

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> (Kleinwinkel-Röntgenstreuung)
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> (einzelsträngige DNA)
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _m	<i>Melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett (100 bis 380 nm)
V	Volumen
V	G, A, oder C nicht T (U) -Nukleinbase
V	Volt
VIS	<i>Visible Light</i> (sichtbares Licht ca. 380 bis 640 nm)
Vs.	Versus
w	<i>Weight</i> (Gewicht)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	Zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
λ	Lambda

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung verschiedener Methoden zur Selektion von DNA-Aptameren für drei Oberflächenmoleküle, die Gegenstand aktueller Krebs- oder bakterieller Biofilm-Forschung sind.

Das Protein *cluster of differentiation 24* (CD24) ist ein Zelloberflächenglykoprotein, das vor allem auf hämatopoetischen Zellen und auf vielen Arten von Tumorzellen präsentiert wird. Das *CD24*-Gen wird als Onkogen bezeichnet und der Grad der Überproduktion des Genproduktes korreliert mit der Schwere der Krebserkrankung. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch wenig erforscht. Allerdings wurde gezeigt, dass das Targeting von CD24 mit verschiedenen Antikörpern das Fortschreiten der Krankheit hemmt.

Das zweite eukaryotische Oberflächenmolekül, *cluster of differentiation CD54*, das auch als ICAM-1 bekannt ist, ist nicht nur für die Adhäsion der Zellen verantwortlich, sondern auch für die daraus resultierende Extravasation (Migration in umgebende Gewebe). Dieser Vorgang spielt vor allem bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle, um die Leukozyten zu deren Wirkungsort zu bringen. Auch die Krebszellen können diesen Mechanismus zur organotropen Metastasierung nutzen.

Das große *extracellular binding Protein* (Embp) kommt auf der Oberfläche von prokaryotischen Zellen vor. Es kann an die humane Fibronectin-Domäne-III (FNIII) binden und dadurch dem Bakterium *Staphylococcus epidermidis* seine Virulenz verleihen.

Nukleinsäure-Aptamere (in dieser Arbeit kurz Aptamere genannt) sind Oligonukleotide, die in einem als SELEX (systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) bezeichneten Selektionsprozess aus zufälligen DNA- oder RNA-Bibliotheken aufgrund ihrer hohen Affinität und spezifischen Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül angereichert werden. Aptamere können somit als Alternative zu Antikörpern verwendet werden.

Um einen Einblick in die Rolle der drei oben genannten Oberflächenproteine und deren Interaktionspartner zu erhalten, sollten in der vorliegenden Arbeit entsprechende Aptamere selektiert werden, wobei mehrere SELEX-Experimente durchgeführt, variiert und evaluiert wurden. Für zwei Fragmente des Embp-Proteins (Embp125 und 170) wurden mittels dreier SELEX-Methoden nicht nur für beide Fragmente targetaffine

ZUSAMMENFASSUNG

Pools erhalten, sondern auch Moleküle identifiziert, die durch das Vorhandensein charakteristischer Sequenz- oder Struktur motive als potenzielle Embp-Aptamere fungieren können. Eine Selektionsmethode, bei der die Primer-Regionen während der Inkubation mit dem Target blockiert wurden, resultierte in einem besonders homogenen DNA-Pool. Die nach dieser SELEX identifizierten Oligonukleotide zeigten eine höhere Stabilität im Vergleich zu den mit konventionellen Methoden selektierten DNA-Molekülen.

Bei den beiden CD-Molekülen erwies sich die Zell-SELEX als Methode der Wahl. Für die Selektion von ICAM-1-affinen Nukleinsäuren wurde eine CD54 *Knockdown*-Variante der HCT116-Zellen eingesetzt. Die selektierten Oligonukleotid-Pools konnten spezifisch an das ICAM-1-Molekül binden, welches von der parentalen HCT116 Zelllinie präsentiert wird.

CD24-spezifische DNA-Aptamere können dazu beitragen, bessere Einblicke in die Rolle von CD24 und seiner Interaktionspartner zu erhalten. Zur Optimierung wurden auch hier mehrere SELEX-Experimente durchgeführt. Dabei wurden sechs Aptamere mithilfe einer Zell-SELEX mit HT-29-Zellen sowie der CD24 *Knockdown*-Variante dieser Zelllinie selektiert und anschließend analysiert. Für eine Auswahl dieser Aptamere wurden Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich (18–709 nM) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Strukturanalyse des stärksten Binders CD24A_2 zeigte, dass dieses Aptamer eine stabile G-Quadruplex-Struktur ausbildet, die nicht durch Ioneneinfluss (Li^+) verloren geht. Außerdem wurde bewiesen, dass das Aptamer zu 30% von den Zellen internalisiert wird. Das steht im Einklang mit vorherigen Experimenten mit CD24-Antikörpern. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das Aptamer nicht an der gleichen Stelle wie der CD24-Antikörper bindet. Dieses CD24-Aptamer könnte dem *molecular profiling* dienen. So wäre es denkbar, bestimmte somatische Veränderungen aufzuspüren und dadurch die Diagnose und Behandlung von Krebs deutlich zu verbessern. Weiterhin könnten die Aptamere als Alternative zur Immuntherapie angewendet werden, um Signalwege zu inhibieren, die den metastatischen Prozess fördern.

ABSTRACT

Abstract

During this work several SELEX methods have been established to select DNA aptamers for three surface molecules that are the subject of current cancer or bacterial biofilm research.

The cluster of differentiation 24 (CD24) is a surface glycoprotein that is mainly presented on hematopoietic cells and on many types of tumor cells. CD24 is an oncogene and its production rate directly correlates with the severity of the cancer disease. The underlying mechanisms of actions are still poorly understood. However, targeting of CD24 with various antibodies led to inhibition of the progression of the cancer disease.

The second molecule in question from the eukaryotic surface was the cluster of differentiation CD54, also known as ICAM-1. It initiates binding to the cell surface and is thus responsible not only for the firm adhesion of the cells to endothelium, but also for the resulting extravasation (migration into the surrounding tissue). This process plays an important role, especially in inflammatory processes, bringing the leukocytes to their place of action. Also, cancer cells can use this mechanism for organotropic metastasis processes.

The large extracellular binding protein (Embp) is presented on the surface of prokaryotic cells. It is able to bind to the human fibronectin type III domain and is responsible for the virulence of the bacterium *Staphylococcus epidermidis*.

Nucleic acid aptamers (in this dissertation termed throughout solely as aptamers) are oligonucleotides, which are selected from random DNA or RNA libraries due to their high affinity and specific binding to a particular target molecule. Those oligonucleotides can be used as an alternative to antibodies. In order to gain insight into the role of the three surface proteins mentioned above and their interacting partners, several SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) experiments were performed to select corresponding DNA aptamers.

In order to enrich the DNA pools with the respective target-affine molecules, different modifications of the SELEX technique were implemented. For two fragments of the Embp protein (Embp125 and 170), three SELEX methods were successfully performed. Not only pools with affinity to both targets were obtained, but also molecules, which had a characteristic sequence or structural motifs that could

ABSTRACT

potentially act as Embp aptamers. A more homogeneous DNA-Pool resulted from one SELEX in which the primer regions were blocked during the incubation time compared to the conventional SELEX methods. Also, the oligonucleotides resulting from this SELEX showed relative higher stability.

In case of the two CD molecules, cell-SELEX proved to be the method of choice. For the selection of ICAM-1 affine nucleic acids, HCT116 cells as well as the respective CD54 knockdown variant were used. The selected pool of oligonucleotides bound specifically to the ICAM-1 molecules presented on the parental HCT116 cell line.

Several SELEX experiments were performed in order to select CD24-specific DNA aptamers. Six aptamers were successfully selected using HT-29 cells producing CD24 as well as CD24 knockdown HT-29 cells. For those aptamers, dissociation constants in the nanomolar range (18-709 nM) were determined by flow cytometry.

Structural analysis of the best aptamer (CD24A_2) revealed formation of a stable G-quadruplex structure that was not destroyed in the presence of lithium ions (Li^+). In addition, it was observed that 30% of the aptamer was internalized into the cells. This is in accordance with previous studies using CD24 antibodies. Moreover, the results obtained in this work showed that CD24A_2 does not interact with the target at the same site as the CD24 antibody. In conclusion, the selected CD24 aptamers could be used for molecular profiling. For example, it might be possible to detect certain somatic changes and thereby significantly improve the diagnosis and treatment of cancer. Furthermore, the aptamers could be used as an alternative to immunotherapy to inhibit signaling pathways, which can lead to cancer formation.

1 Einleitung

1.1 Aptamere

Nukleinsäure Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsäuren-Polymere (DNA oder RNA) oder deren Derivate, die ihre Targets mit einer hohen Affinität und Spezifität binden können. Die typischen Dissoziationskonstanten (K_d), welche ein Maß für die Bindungsaffinität darstellen, liegen bei Aptameren im niedrigen Nanomolar- bis Picomolarbereich.¹ Die Erkennung der Targets erfolgt anhand der dreidimensionalen (3D) Faltung des Oligonukleotides. Hierbei bildet das Aptamer eine sequenz- sowie pufferabhängige Struktur aus und kann somit an das Zielmolekül binden (Abb. 1).^{2,3,4} Diese Eigenschaft kann auch aus dem Namensursprung abgeleitet werden, welcher sich aus dem lateinischen *aptus* (passen) und dem griechischen Wort *meros* (Teilchen) zusammensetzt. Den Aptameren können verschiedenste chemische und biologische Moleküle als Liganden dienen: Ionen, anorganische und organische Moleküle, Zellen oder sogar ganze Gewebe.⁵⁻⁹

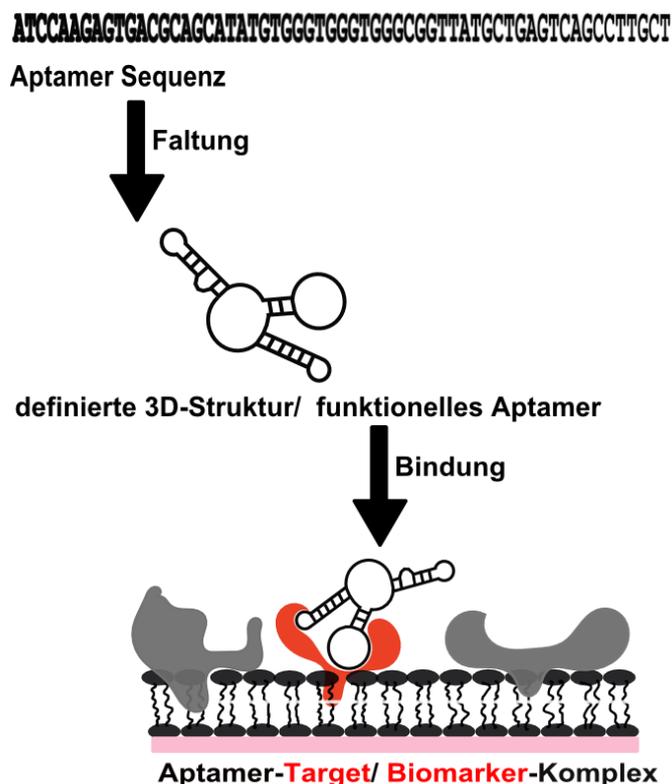


Abb. 1: Die Aptamer-Target Bindung. Das einzelsträngige Oligonukleotid kann sich aufgrund seiner Sequenz und den Pufferbedingungen falten. Aufgrund der entstandenen 3D-Struktur wird der Ligand spezifisch erkannt und mit hoher Affinität nichtkovalent gebunden.

EINLEITUNG

Die Aptamere dienen nicht ausschließlich nur als Binder, sondern können auch als Antagonisten fungieren. Durch gezieltes Ansteuern der Bindungstasche kann die Interaktion zwischen zwei Komponenten unterbunden werden und resultiert folglich in einer Inhibierung von bestimmten enzymatischen Aktivitäten.⁴ Der Wirksamkeitsverlust ist meist reversibel. Dies ist relevant bei therapeutischen Agenzien, da die Funktion des Ligandes nach dem Entfernen des Aptamers, wiederhergestellt werden kann.¹⁰ Die Abspaltung des Oligonukleotides von seinem Target kann sowohl sequenzspezifisch als auch -unspezifisch erfolgen.^{11–13}

Aufgrund ihrer Interaktion und Wirkungsart, wie z. B. deren regulatorischer Einfluss, ähneln Aptamere den natürlich vorkommenden *Riboswitches*.^{14–16} So führte die nahliegende Verbindung von Aptameren mit Ribozymen/DNAzymen zur Entwicklung von Aptazymen und den Aptasensoren.¹⁷ Diese künstlichen *Riboswitches* können der Aktivierung und Deaktivierung von diversen biologischen (z. B. der Genexpression) oder chemischen Prozessen dienen und somit in der Therapie oder in der Sensorik eingesetzt werden.¹⁸

1.1.1 Aptamere vs. Antikörper

Aptamere sowie Antikörper haben ein breites Anwendungsspektrum. Sie können als Wirkstoffe, diagnostische Werkzeuge, analytische oder therapeutische Reagenzien (Wirkstofftransporter), Aptasensoren (Biosensoren) oder auch zur Bildgebung (*bio-imaging*) dienen.^{19–23} Genau wie Antikörper zeigen diese Oligonukleotide eine analoge Bindungsaffinität gegenüber ihren Targets. Allerdings weisen Aptamere weitere Eigenschaften auf, die sie von ihren Aminosäure-basierten Gegenstücken deutlich abheben und somit eine Alternative darstellen. Im Gegensatz zu Antikörpern sind die Oligonukleotide physikalisch und chemisch stabiler, was nicht nur die Handhabung (breiter pH- und Temperaturbereich) erleichtert, sondern auch die Langzeitaufbewahrung ermöglicht. Nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen oder langen Denaturierungszeiten können Aptamere immer wieder neu gefaltet werden. Ein weiterer Vorteil von Aptameren gegenüber den Immunglobulinen (Ig) ist die einfache *in vitro* Herstellung sowie weitere Möglichkeiten zur Modifizierung. Hierbei zählen die Festphasen-Synthese, die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Strangtrennung und im Falle von RNA die Transkription zu den gängigsten Synthesemethoden. Im Gegensatz dazu werden Antikörper meistens *in vivo*

EINLEITUNG

hergestellt, um die spezifischen Glykosylierungsmuster zu gewährleisten. Dieser Syntheseweg hat den Nachteil, dass einzelne Chargen sich voneinander unterscheiden können, was in einer geringeren Reproduzierbarkeit resultiert. Auch die Gefahr von viralen oder bakteriellen Kontaminationen ist bei der Antikörperproduktion deutlich höher als bei der Oligonukleotidsynthese.

Mittels der maßgeschneiderten chemischen Derivatisierung der Aptamere können sowohl ihre Bindungsaffinität als auch ihre Bioverfügbarkeit *in vivo* erhöht werden. Die Modifikationen können außerdem die Detektion eines Targets oder den zielgerichteten Transport eines Wirkstoffes ermöglichen. Im Falle von Antikörpern ist die chemische Konjugation, z. B. an therapeutischem Cargo, nicht nur äußerst komplex und erfordert Erfahrung, sondern ist ebenfalls mit hohem finanziellen Aufwand verbunden. Bei Aptameren hingegen kann dies z. B. über eine Hybridisierung von kurzen, komplementären Basenabfolgen (z. B. Aptamer an Aptamer oder Aptamer an siRNA) oder mittels einer PCR geschehen. Darüber hinaus ist die Synthese von Nucleinsäuren auch in großen Mengen leicht durchführbar. Aufgrund der kleinen Molmassen können Aptamere zudem rein von der Größe her betrachtet (üblicherweise zwischen 3 und 30 kDa) Gewebe leichter als Immunglobuline (50-150 kDa) passieren.²⁴ Hinzu kommt, dass die Wirkung der Aptamere durch sogenannte „Antidote“ gesteuert werden kann. Dabei werden die *Antisense*-Oligonukleotide eingesetzt, um die Aptamere zu binden und somit ihre Aktivität zu unterdrücken.^{10,25}

Im Falle des monoklonalen Antikörpers Ipilimumab, welcher durch die *Food and Drug Administration* (FDA) als immunstimulierendes Medikament zugelassen wurde, konnte eine signifikante dosisabhängige Toxizität nachgewiesen werden.²⁶ Auch bei den anderen Immunglobulin-basierten Wirkstoffen wurden lebensbedrohliche Nebenwirkungen, wie z. B. Neutropenie festgestellt.²⁷ Die Oligonukleotide dagegen zeigen keine bzw. nur eine geringe Immunogenität auf.²⁸

Diese aufgeführten Vorteile der Aptamere im Vergleich zu ihren peptidbasierten Pendanten deuten auf ihr therapeutisches Potenzial hin. Deswegen wurden bereits viele Nucleinsäuren selektiert, die gezielt Targets ansteuern, welche bei vielen Krankheiten (Abb. 2) wichtige Rollen spielen.^{20,29–35}

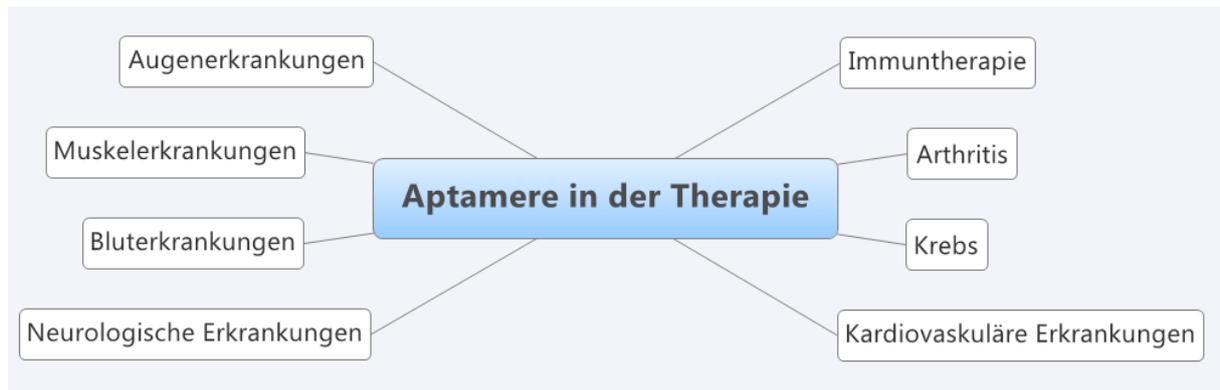


Abb. 2: Die potenziellen therapeutischen Anwendungsgebiete der Aptamere.

1.1.2 Zell-SELEX

Seit der Entwicklung der SELEX-Technik (systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) konnten bereits viele Aptamere selektiert werden. Im Standard-Protokoll werden Oligonukleotide selektiert, die spezifisch für rekombinante Proteine sind. Nachteil dieser Methode ist, dass sich die Affinität der so erzeugten Aptamere zu Zelloberflächen-Komponenten signifikant verringern kann, sobald sie den auf den Zelloberflächen präsentierten nativen Targets angeboten werden.³⁶ Um dieses Problem zu umgehen, wird eine besondere Art, die Zell-SELEX-Methode, angewendet (Abb. 4). Bei der Zell-SELEX befinden sich die Targets nicht nur in ihrer nativen Faltung, sondern weisen auch ihre natürlich vorkommenden Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen auf.

Die ersten Versuche in Richtung Zell-SELEX waren Selektionen, bei denen Membranproteine aus Zelloberflächenextrakten als Target genutzt wurden.³⁷ Dabei wurden Aptamere identifiziert, die unterschiedliche Epitope der roten Blutkörperchen binden.³⁷ Eine der ersten Zell-SELEX mit lebenden Zellen wurde 2001 erfolgreich durchgeführt.³⁸ Daraus resultierende Aptamere banden an stabil transfizierte endotheliale Zellen und konnten somit *Microvessels* im Glioblastom erkennen.³⁸

Folglich können mit Hilfe der Zell-SELEX-Methode Aptamere selektiert werden, die zellspezifische Unterschiede in der Produktion von Oberflächenproteinen erkennen.³⁷⁻⁴⁰ Somit können diese Aptamere zwischen Subtypen von Zellen mit einem homologen Ursprung unterscheiden. Dies findet Verwendung z. B. bei der Differenzierung zwischen Zellen mit normaler und maligner Natur. Ein Beispiel hierfür sind Aptamere,

EINLEITUNG

die hochaffin an Leukämiezellen binden und nicht mit gesunden CD3-positiven T-Zellen interagieren.^{8,40} Insbesondere die frühzeitige Erkennung der morphologischen Veränderungen kann zu einer effizienten Krebsbehandlung führen.⁴¹

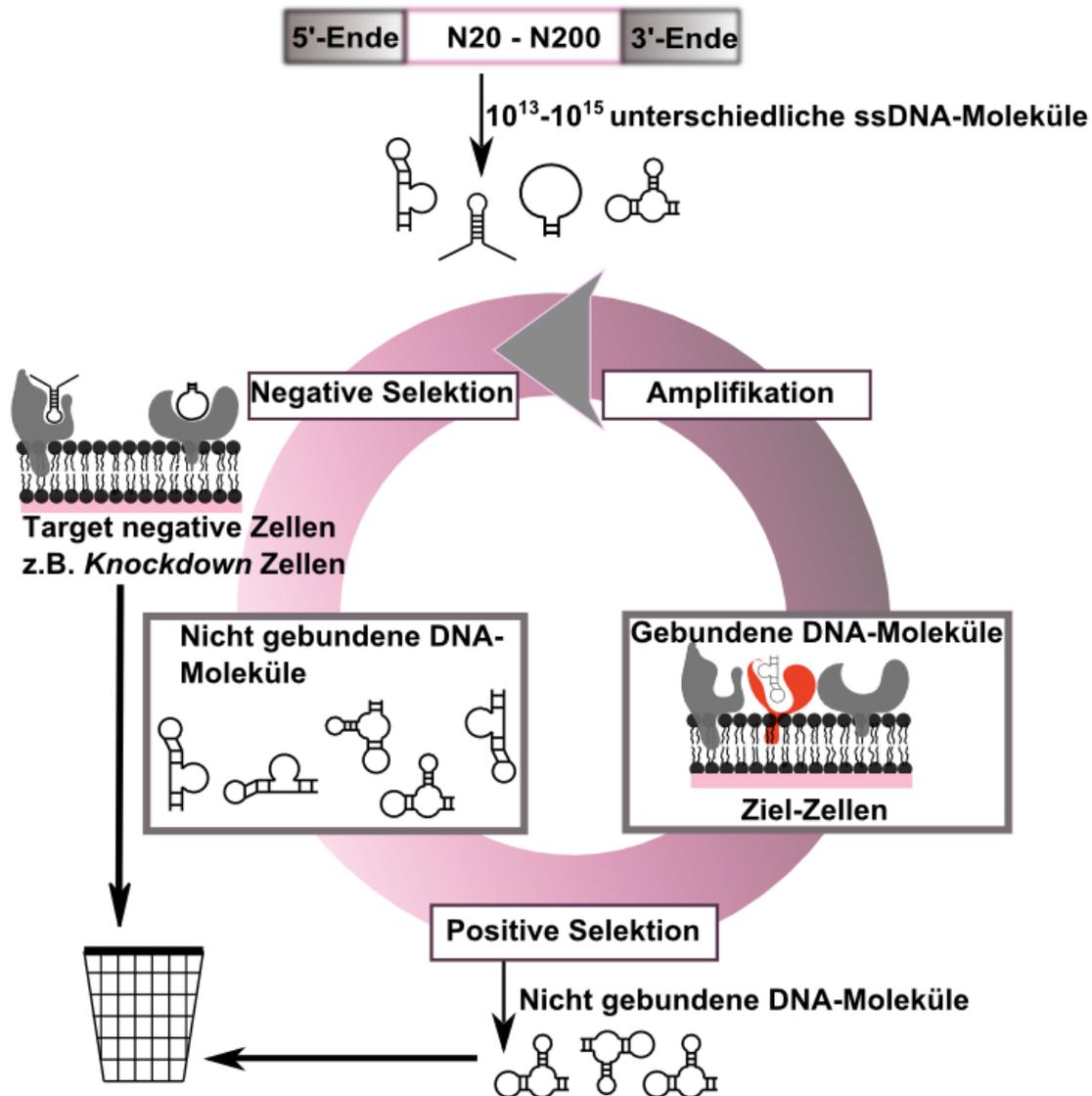


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zell-SELEX-Methode. Nach der Inkubation der ssDNA Pools mit Target-negativen Zellen werden die nicht gebundenen DNA-Moleküle mit den Ligand-produzierenden Zellen inkubiert. Nach dem Trennen des Zell-DNA-Komplexes erfolgt die Amplifikation der affinen Moleküle. Um den DNA-Pool einer weiteren SELEX-Runde zu unterziehen, wird eine ssDNA generiert. Nach mehreren SELEX-Runden werden die DNA-Moleküle mittels Klonierungstechniken voneinander getrennt und hinsichtlich ihres Bindevermögens getestet. Modifiziert nach Ohuchi *et al.*⁴²

1.2 Selektion von Aptameren

Anfang der 90er Jahre ist es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelungen, eine prinzipiell sehr einfache aber gleichzeitig revolutionäre Methode für die Selektion von Target-spezifischen Oligonukleotiden zu entwickeln.^{43,44}

EINLEITUNG

Grundlage für diese Methodenentwicklung war die wenige Jahre zuvor entdeckte Polymerasekettenreaktion.⁴⁵ Seitdem ist es unter der Zuhilfenahme der SELEX-Technik möglich, aus einer sehr großen, kombinatorischen Bibliothek (10^{10} - 10^{15} Moleküle) Oligonukleotide in Bezug auf ihre Affinität zu den gewünschten Zielmolekülen zu isolieren (Abb. 3). Diese Methode stellt eine iterative Anreicherungstechnik dar. Hierbei lassen sich von Runde zu Runde Nukleinsäuremoleküle isolieren, die durch ihre sequenzabhängige Faltung unter gegebenen Bedingungen Targetmoleküle spezifisch erkennen und binden können (Abb. 1). Die SELEX-Ausgangsbibliotheken weisen randomisierte Bereiche von 20 bis 200 Nukleotiden (nt) auf. Das zusätzliche Flankieren der Oligonukleotide mit konstanten Primer-Bindungsstellen auf beiden Strangenden ist nicht nur essentiell für die Vervielfältigung der DNA, sondern kann auch zusätzlich weitere, enzymatische Reaktionen ermöglichen.⁴⁶

Eine Selektionsrunde beinhaltet mehrere Schritte: Inkubation, Elution, Amplifikation und die abschließende Präparation des Nukleinsäure-Pools für die nachfolgende SELEX-Runde (Abb. 4). Gewöhnlich wird das Target vor der SELEX immobilisiert. In diesem Fall wird ein negativer Selektionsschritt erforderlich, um die Matrixbinder aus dem Selektionspool zu eliminieren. Zu beachten ist, dass abhängig von der verwendeten Immobilisierungs-Technik auch die Faltung des Targets negativ beeinflusst werden kann. Dies kann z. B. einen Verlust der biologischen Aktivität des Zielmoleküls zur Folge haben. Deswegen ist es wichtig, die SELEX-Bedingungen möglichst nah an dem Zielsystem zu orientieren. Hierzu werden Parameter wie Temperatur, Pufferbedingungen inklusive der Polarität der Lösung und die Ionen-Zusammensetzung ermittelt. Folglich wird der Selektionsdruck konstant ausgeübt womit die Moleküle angereichert werden, die die stärkste Antwort auf den Selektionsprozess zeigen. Dies kann unter anderem durch die Veränderung der folgenden Parameter erreicht werden: Zunahme der Waschschrte und des Waschvolumens sowie die sukzessive Erhöhung der Kompetitor-Menge.

EINLEITUNG

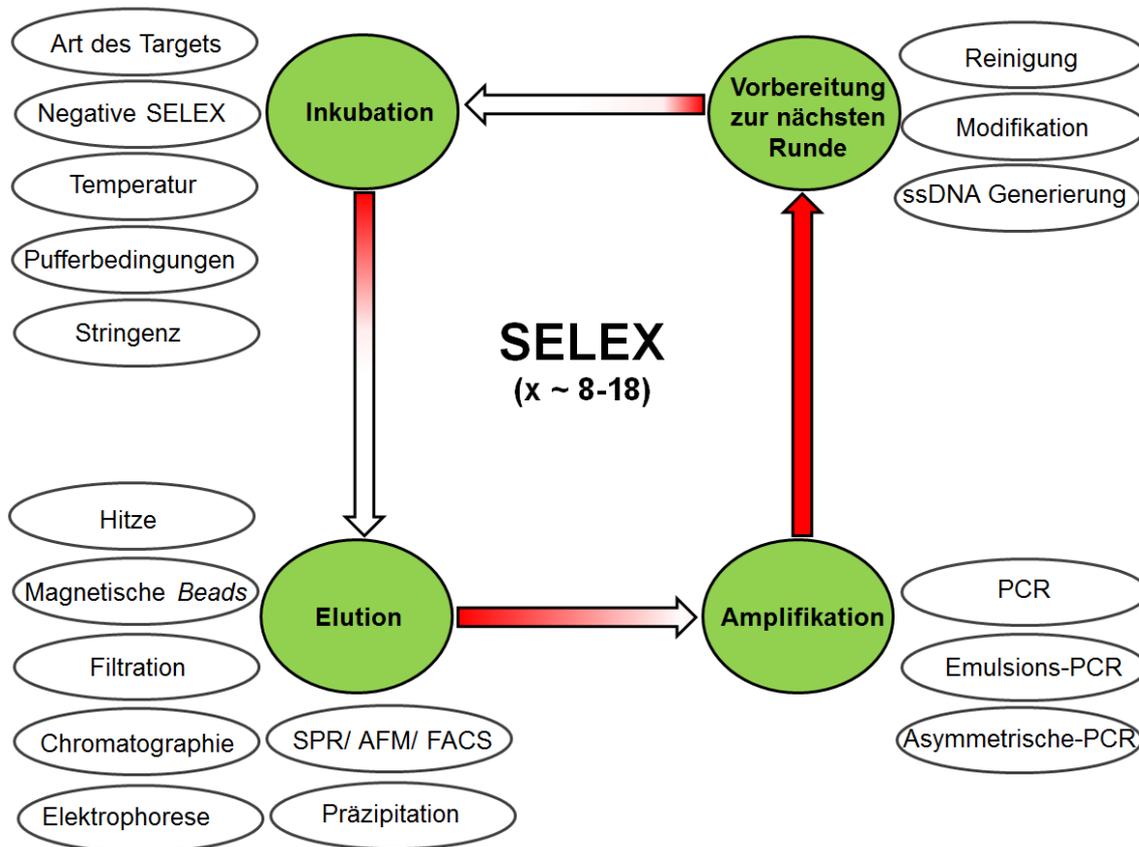


Abb. 4: Darstellung einer SELEX-Runde. Jede SELEX-Runde besteht aus mehreren Schritten: Inkubation, Elution, Amplifikation und die Vorbereitung der Nukleinsäuren auf die nächste Runde. Die wichtigen Aspekte der jeweiligen Schritte sind in transparenten Ellipsen dargestellt. Bei dem SELEX-Prozess werden die Selektionsrunden mehrmals wiederholt (in der Regel 8-18 Mal).

Im nächsten Schritt werden die an das Target gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Hierbei können unterschiedliche Separationstechniken genutzt werden. Eine gängige Trennungsmethode stellt das Abtrennen der Nukleinsäuren (oder Proteine) von den magnetischen *Beads* durch andere Substituenten, wie z. B. Imidazol, dar – wenn z. B. rekombinante Target-Proteine einen sogenannten His-Tag tragen. Dabei werden die Histidine kompetitiv aus dem Chelatkomplex (mit Co^{2+} oder Ni^{2+} -Ionen der Festphase) verdrängt. Auch der Einfluss der Temperatur durch die Veränderung der 3D-Struktur der Interaktionspartner wird oft ausgenutzt.

Die eluierten Nukleinsäuren können im nächsten Schritt amplifiziert werden. Dabei spielt die akkurate Vervielfältigung des heterogenen DNA-Pools eine ausschlaggebende Rolle für den Erfolg des Selektionsprozesses. Dies führt immer häufiger dazu, dass Abwandlungen der traditionellen PCR-Methoden angewendet werden, wie z. B. die ddPCR, welche die Bildung von Nebenprodukten verhindern sollen. Die für die nachfolgende SELEX-Runde benötigte ssDNA wird durch den

Abbau des komplementären DNA-Stranges generiert. Die asymmetrische PCR kann diesen Schritt vereinfachen, da hierbei bevorzugt der Leitstrang vervielfältigt wird. In einigen Fällen werden auch andere Modifikationen vorgenommen, z. B. die Veränderung von DNA-Strängen mittels *Click*-Chemie für die Selektion der äußerst affinen *Clickmere*.⁴⁷ Abschließend werden die Nukleinsäuren gereinigt und nach der Konzentrationsbestimmung in weiteren SELEX-Runden eingesetzt.

Dank der SELEX-Methode und ihrer unterschiedlichen Abwandlungen (Tab. 38) war es z. B. möglich, effiziente Inhibitoren, Werkzeuge für die Affinitätstrennung, molekulare Detektionssysteme und therapeutische Wirkstoffe zu identifizieren.⁴⁸

1.2.1 Hochdurchsatzsequenzierung zur Identifizierung möglicher Aptamere nach SELEX

Die Selektion von Aptameren wird über mehrere Runden (Abb. 4; ca. 8-18) durchgeführt. Dabei sind die Targetaffinität des Selektionspools und die Menge an vorhandenem Targetmolekül entscheidend, um den Endpunkt des SELEX-Prozesses zu bestimmen. Um die Oligonukleotide zu vereinzeln, wird am Ende der Nukleinsäure-Pool aus der letzten Runde kloniert. Die Inserts der Plasmide der entstandenen Kolonien werden dann sequenziert und bezüglich der Sequenzverwandtschaft, der Stabilität sowie der Strukturvorhersage weiter analysiert. Anschließend werden die ausgewählten Oligonukleotide hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber dem Target untersucht. Diese konventionellen Methoden haben den Nachteil, dass nur ein geringer Datenumfang und somit eine niedrige Anzahl an Sequenzen von DNA-Molekülen aus dem untersuchten DNA-Pool generiert wird. Zudem wurde gezeigt, dass dadurch lediglich eine 5%ige Wahrscheinlichkeit besteht aus 100 Oligonukleotiden diejenigen zu identifizieren, die eine starke Antwort auf den Selektionsprozess aufweisen.⁴⁹ Somit sind die konventionellen Techniken zur Identifizierung von Aptameren daher willkürlich und deswegen wenig effektiv.^{49,50}

Die Verwendung der Hochdurchsatzsequenzierung (HTS, auch NGS genannt für *next generation sequencing*) bietet bei der Analyse des SELEX-Prozesses einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zur klassischen Sanger-Sequenzierung. So ist eine Unterscheidung der spezifisch selektierten Nukleinsäuren von denjenigen möglich, die aufgrund experimenteller Artefakte im Pool angereichert wurden.⁵¹ Desweiteren konnten mehrere Studien zeigen, dass durch den Einsatz der HTS die

EINLEITUNG

Identifizierung von hoch affinen Aptameren bereits innerhalb weniger SELEX-Runden (3-7) erfolgen kann.^{49,51,52} Somit kann der Einsatz dieser Technik die Effizienz des SELEX-Prozesses deutlich steigern. Es ist schon lange bekannt, dass unspezifische Moleküle ebenfalls selektiert und amplifiziert werden. Dies ist insbesondere bei der Zell-SELEX wahrscheinlich, da hier den Oligonukleotiden unzählige Targets angeboten werden.

Darüber hinaus können mit Hilfe von Algorithmen gezielt Struktur motive identifiziert werden, welche für die Bindung an das Target verantwortlich sind.

Seit den Neunzigerjahren wurden mehrere HTS-Techniken entwickelt. In Bezug auf den SELEX-Prozess stellt die sogenannte „Sequenzierung mit Brückensynthese“ die Methode der Wahl dar.⁵³ Hierbei werden die Oligonukleotide zunächst mittels Adaptoren zur Bindung an die Trägerplatte vor der Amplifikation sowie Indizes, um die DNA der entsprechenden SELEX-Runde zuordnen zu können, markiert (Abb. 5).⁵⁴ Im Anschluss werden die einzelsträngigen DNA-Moleküle vervielfältigt.

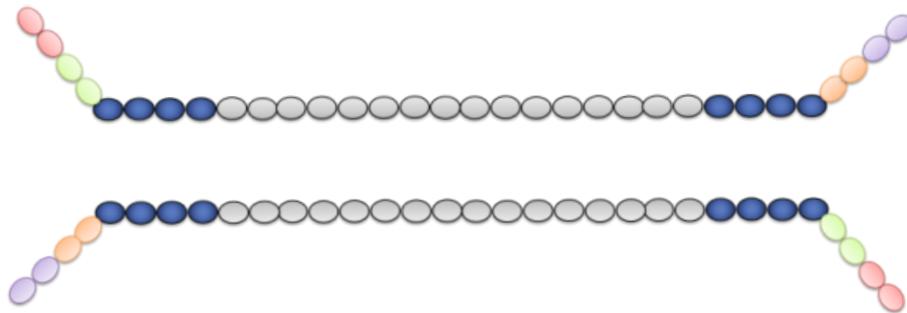


Abb. 5: Die DNA für die NGS-Sequenzierung. Hierzu werden die zu untersuchenden Nukleinsäuren (grau) an den Enden entsprechend verlängert. Blau: Bindungsstellen für die Sequenzierung; grün/orange: Indizes; violett/ rot: Regionen, die zu den Nukleinsäuren auf dem Träger (*flow cell*) komplementär sind. Abbildung modifiziert nach Illumina.⁵⁵

Das Sequenzieren erfolgt mittels CCD-Sensoren (*charge coupled device*) in Echtzeit. Dabei werden die fluoreszenzmarkierten Nukleobasen, die in einem Zyklus pro *cluster* eingebaut sind, detektiert (Abb. 6).⁵⁶

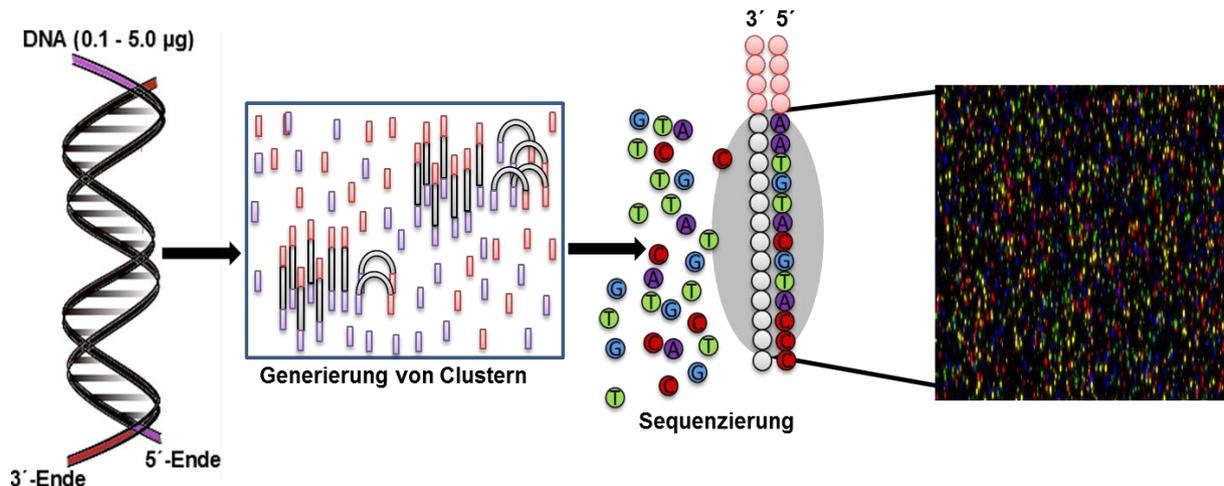


Abb. 6: Prinzip der NGS-Analyse mittels DNA-Brückensynthese. Zunächst binden die DNA-Moleküle an die Trägerplatte, werden amplifiziert und bilden sogenannte „cluster“ aus. Somit entstehen sehr viele Kopien der eingesetzten Nucleinsäuren. Schließlich werden die Folgestränge abgespalten und nur die Leitstränge verbleiben. Erst jetzt kann die Sequenzierung während der Synthese beginnen. Dabei werden die Nucleobasen mit Fluorophoren markiert und können beim Einbau detektiert werden. Links ist eine CCD-Aufnahme einer Durchflusszelle während der Sequenzierung dargestellt. Abbildung modifiziert nach Illumina.⁵⁵

1.3 Aptamere für komplexe Targets

Eine negative Ladung des Targets wirkt sich erschwerend auf die Bindung mit den negativ geladenen Oligonucleotiden während des SELEX-Prozesses aus. Die Firma SomaLogic Inc. hat eine Alternative entwickelt (SOMAmers für *Slow off-rate modified aptamer*), um eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber Targets zu erzielen, die schwer mit konventionellen Nucleinsäuren adressiert werden können.

Ein weiteres Problem ist die Herstellung von Aptameren für Targets, deren Tertiärstruktur durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst wird. Dies zeigt sich besonders im Falle von Membran-verankerten Proteinen. Diese werden oft durch Phosphorylierung, Glykosylierung und/ oder Myristoylierung verändert. Zudem kommt noch dazu, dass Targets die keine definierte 3D-Struktur ausbilden, nur bedingt mit Aptameren adressiert werden können.

1.3.1 Zelloberflächenproteine als Targets für Aptamere

Aptamere, welche Oberflächenproteine spezifisch erkennen und binden, können in der Diagnostik und in der Therapie *per se* (Abb. 7, linkes, gelbes Panel) oder als ein Transporter für Wirkstoffe (Abb. 7, rechtes, blaues Panel) eingesetzt werden. So ist es

EINLEITUNG

vorstellbar mittels Aptameren die Rezeptoren eines Virus anzusteuern und dadurch den Eintritt des Erregers in die Wirtszelle zu unterbinden.

Die Verwendung von Aptameren als Wirkstoff-Transporter in der Therapie dagegen erklärt sich dadurch, dass diese ohne Spezifitätsverluste an weitere Moleküle gekoppelt werden können.

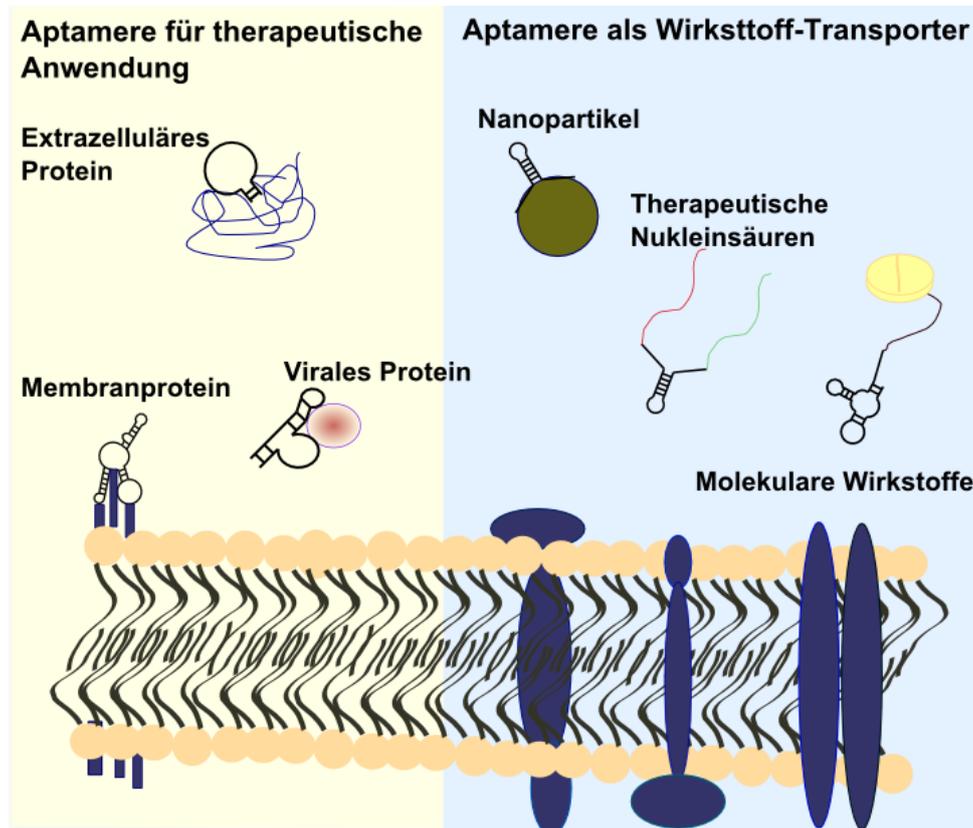


Abb. 7: Mögliche Anwendungen von Aptameren für Oberflächenproteine. Aptamere können die Bindungsstellen von Interaktionspartnern besetzen und somit ihre Funktion unterbinden (links). Zusätzlich können solche Aptamere als Transportmittel für diverse Wirkstoffe dienen (rechts). Abbildung modifiziert nach Poolsup *et al.*⁵⁷

Viele Oberflächenproteine sind als *cluster of differentiation* (CD) bekannt. Diese Klasse von Adhäsionsproteinen wird vor allem von Zellen produziert, die eine Rolle bei der immunologischen Antwort spielen (z. B. Leukozyten). Außerdem sind diese an der intrazellulären Kommunikation beteiligt, da sie neben Signal- und Rezeptorfunktionen auch enzymatische Eigenschaften aufweisen.

Heutzutage fungieren CD-Moleküle als essenzielle Zellmarker bei der biomedizinischen Forschung, in der Diagnostik (Immunphänotypisierung) sowie bei der Herstellung biotechnologischer Erzeugnisse. Mittlerweile wird zwischen 401 humanen CD-Molekülen unterschieden. In der Nomenklatur werden die CD-Moleküle

EINLEITUNG

mit Nummern von 1 bis 371 versehen. Die zusätzlichen Kennzeichen stehen z. B. für heterogene Produkte des gleichen Gens, Produkte derselben Genfamilien oder aber für Moleküle die ein gemeinsames Strukturmerkmal besitzen.⁵⁸

1.3.1.1 Adhäsionsmoleküle und Krebs

Da Adhäsionsmoleküle für Zell-Zell-Kontakte verantwortlich sind, spielen diese eine entscheidende Rolle bei Krebserkrankungen. Dabei sind die Metastasierungsprozesse für den tödlichen Verlauf der Krankheit verantwortlich. Bei Patienten, die einen sekundären Tumor ausbilden, sinkt die Lebenserwartung um das Fünffache (Abb. 8). Dies betrifft vor allem die aggressiven Krebsarten welche Speiseröhre, Lunge und Pankreas angreifen.

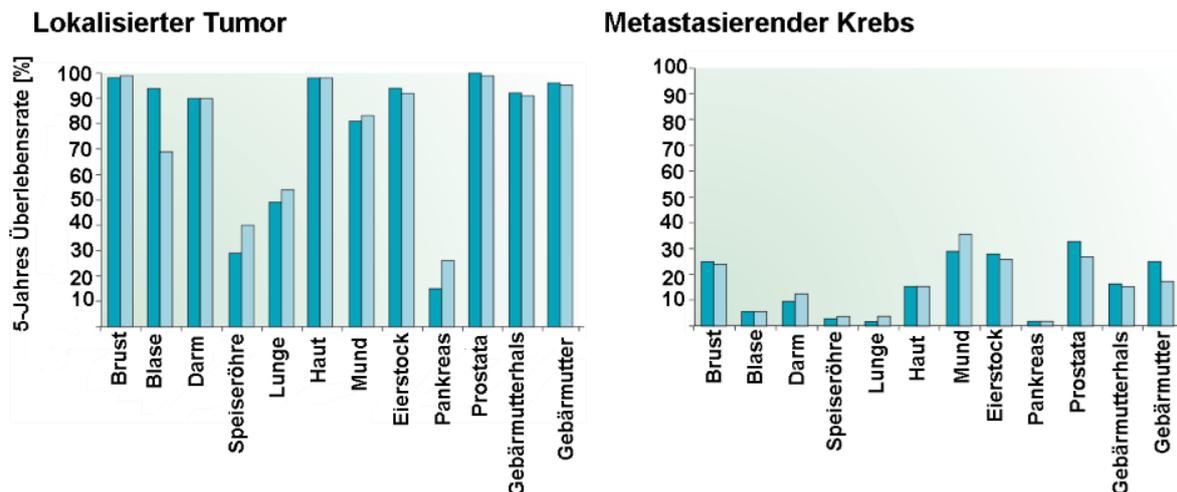


Abb. 8: Überlebensrate von Krebs-Patienten abhängig von dem Ort der Tumorbildung. Auf den beiden Panels zeigen die dunkelblauen Balken die Zahlen aus dem Jahr 2005 und die hellblauen Balken die Zahlen aus dem Jahr 2015. Auf dem rechten Panel sind die Überlebensraten für Patienten gezeigt, deren Krebs lokalisiert war und auf dem linken Panel für Patienten, deren Krebs metastasierte. Abbildung modifiziert nach Steeg *et al.*, 2016.⁵⁹

Damit ein Tumor in entfernte Gewebe wandern kann, müssen sich erst Zellen aus dem Primärtumor lösen. In Intravasationsprozessen gelangen die Zellen in die Blutbahn, wo sie über Oberflächenmoleküle mit Endothelzellen interagieren können. Nachdem die Zellen fest adhären, können die Krebszellen im weiteren Prozess der Extravasation in die umliegenden Gewebe passieren und somit einen sekundären Tumor ausbilden (Abb. 9).

EINLEITUNG

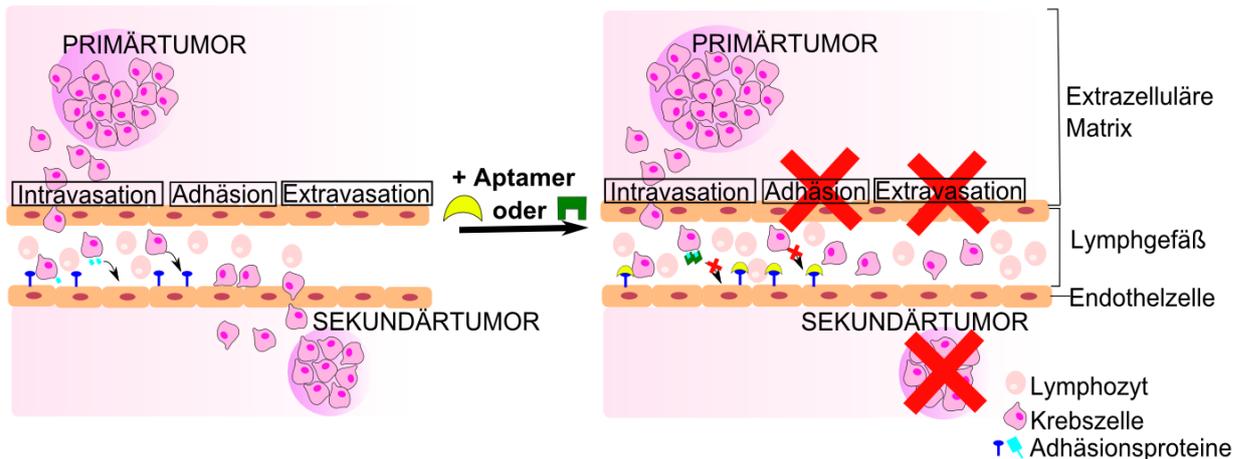


Abb. 9: Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses. Eine Krebszelle kann in einem Intravasationsprozess in die Blutbahn gelangen. Dort kann die Zelle eine feste Adhäsion mit den Oberflächenmolekülen der Endothelzellen eingehen. Daraus resultiert die Extravasation, was den Austritt aus der Blutbahn beschreibt. Durch den Metastasierungsprozess können somit Zellen in entfernten Geweben einen sekundären Tumor ausbilden. Die Abbildung wurde bereits publiziert und für die vorliegende Doktorarbeit weiter modifiziert.⁶⁰

Durch gezieltes Targeting solcher Oberflächenmoleküle ist es denkbar, nicht nur dem Metastasierungsprozess entgegenzuwirken, sondern auch die grundlegenden Mechanismen der Krebsausbreitung weiter zu erforschen.

So können CD-Molekül-affine Spezies auch als Tumormarker oder Tumorimpfstoffe eingesetzt werden.

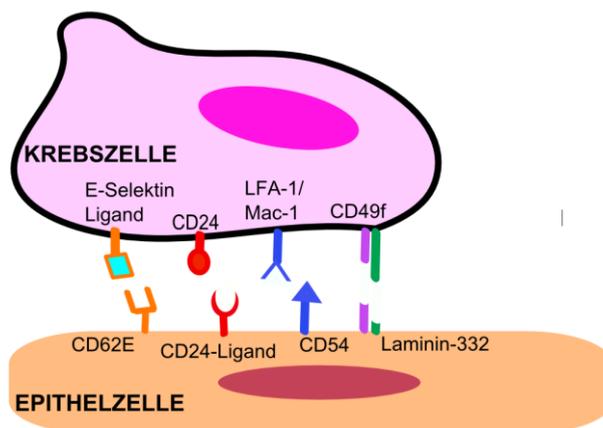


Abb. 10: Schematische Darstellung von ausgewählten CD-Molekülen, die eine Rolle bei der Krebsprogression spielen können. Die Abbildung wurde bereits publiziert und für die vorliegende Doktorarbeit weiter modifiziert.⁶⁰

In der Arbeitsgruppe Hahn an der Universität Hamburg wurden bereits spezifische und hoch affine ($K_d=100-150$ nM) Aptamere für E- und P-Selektin (CD62E und -62P) sowie für die $\alpha 6$ -Untereinheit von Integrin (CD49f) identifiziert.⁶¹⁻⁶³ Diese Aptamere zeigen inhibierende Eigenschaften der molekularen Wechselwirkungen, die bei der Krebs-

Progression von Bedeutung sein können. Faryammanesh *et al.*, konnten nachweisen, dass das Aptamer trotz physiologischer Scherkräfte immer noch gebunden hat und dabei die Adhäsion zwischen Krebszellen und CD-Molekülen hemmte. Das lässt besonders auf den möglichen therapeutischen Ansatz dieser Aptamere hoffen.⁶³

1.3.1.2 CD24 als Markerprotein und Therapieangriffspunkt der Krebsforschung

Das humane CD24-Molekül weist bei seiner relativ kurzen Länge von 32 Aminosäuren (AS) einen hohen und dabei variablen Grad der Glykosylierung (Abb. 11) auf. Es ist mit der Zellmembran durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) verbunden.⁶⁴ Platziert in den cholesterolreichen Bereichen der Zellmembran, den sogenannten *Lipid-Rafts*, dient es der Zell-Zell-Adhäsion und der Signaltransduktion.^{64,65} Es weist eine gemeinsame genetische Herkunft mit dem murinen HSA-Molekül (*heat stable antigen*) auf. Die Aminosäuresequenzen der beiden Moleküle sind zu 66% identisch (Abb. 11).^{66,67} Aufgrund der Unterschiede in den Produktionsmustern stellen die CD24-Moleküle eine Gruppe strukturell diverser Glykoproteine dar, die eine Masse zwischen 35 und 70 kDa aufweisen.⁶⁸ Das Molekulargewicht von CD24 variiert nicht nur zwischen verschiedenen sondern auch innerhalb eines Zelltyps. Diese unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von CD24 hängen vom Entwicklungsstadium der Zelle und von ihrer Funktion ab. So konnten bisher im Nervensystem drei Glykoformen des CD24-Moleküls identifiziert werden.^{69–71} Dieses variable Glykosylierungsmuster zeigt, dass posttranslationale Modifikationen dieses Moleküls seine Erkennungs-eigenschaften verändern können.⁷² Die Serine und Threonine (50% der AS) können O-glykosyliert werden. Als Substrate für eine N-Glykosylierung dienen potenziell vier Asparaginsäuren. Physiologisch wird das CD24-Protein hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen (z. B. prematuren Lymphozyten), Thrombozyten, Endothel-, Epithel- und Nervenzellen (z. B. Neuroblasten) präsentiert.^{64,68,73} Während der Hämatopoese spielt das Molekül eine entscheidende Rolle bei der Selektion und bei der Reifung der verschiedenen Blutzellen.^{68,74} Es dient als ein lymphoider Differenzierungsmarker und wurde bereits von Zhou *et. al.* und von Wang *et. al.* als genetischer Modifikator und Marker von Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose und des *Lupus erythematoses* identifiziert.^{75,76}

EINLEITUNG

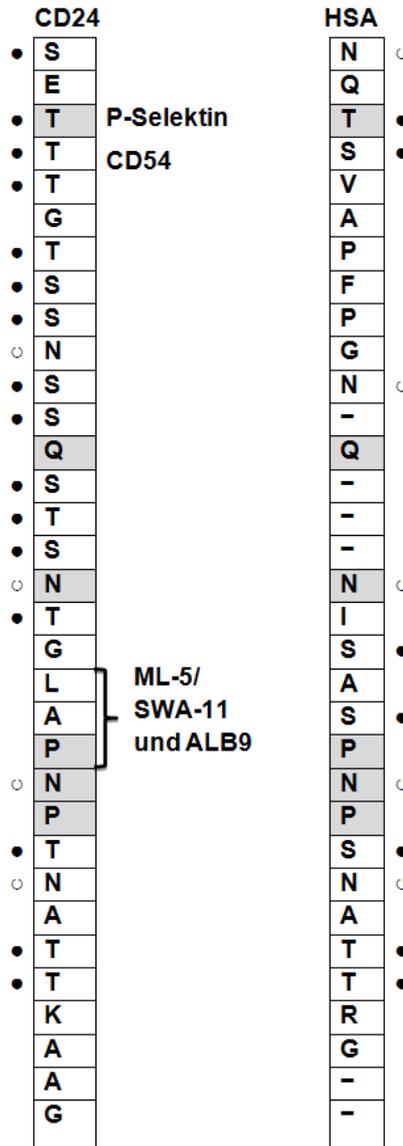


Abb. 11: Schematische Darstellung des CD24-Moleküls im Vergleich zum HSA-Molekül. Das humane CD24-Molekül ist um sechs Aminosäuren länger als sein murines Pendant (HSA-Molekül 26 AS).^{66,67} Die erforschten Bindungsstellen sowie die drei bekannten Antikörper-Epitope sind eingezeichnet, die potentiellen Glykosylierungsstellen wurden durch Punkte markiert (schwarz: Substrate für die *N*-Glykosylierung und weiß: die *N*-Glykosylierungsstellen).

Die CD24-Interaktion mit Sialinsäure-bindendem Protein (Siglec-5), das auf Immunzellen präsentiert wird, kann eine wesentliche Rolle bei der Immunregulation spielen.^{77,78}

Die Tumorzellen der Epithelialgewebe weisen eine stark erhöhte Produktion (91%) der CD24-Moleküle im Vergleich zum gesunden Gewebe (17%) auf.⁷⁹ Diese Tendenz zeigt sich auch bei anderen soliden Tumoren wie Gehirn-, Brust-, Dick-darm-, Leber-, Lungen-, Eierstock- und Prostatakarzinomen. Dabei ist auffällig, dass bei diesen

EINLEITUNG

sieben Tumorarten, die für die höchste Sterberate weltweit verantwortlich sind, die Menge an CD24-Molekülen deutlich erhöht vorliegt (Abb. 12).

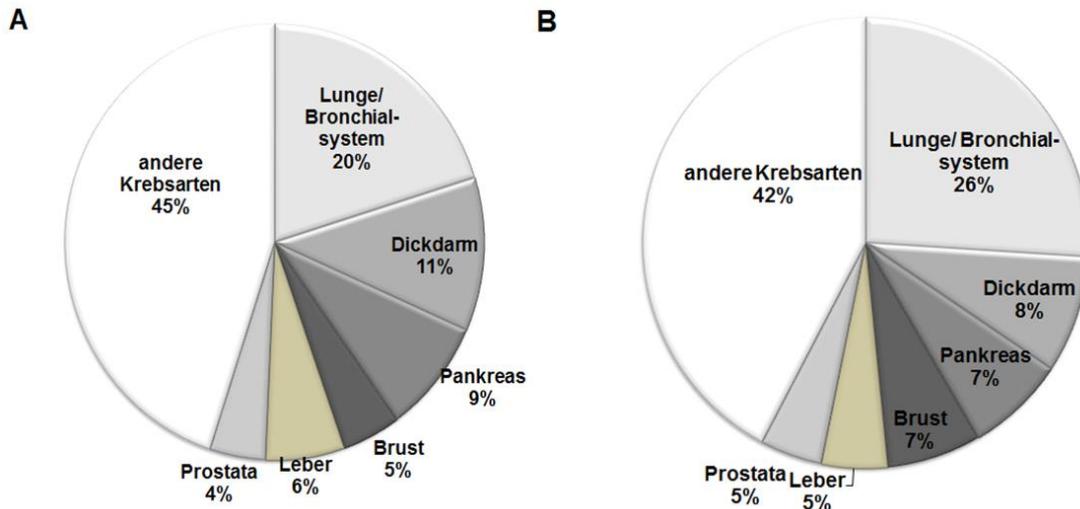


Abb. 12: Geschätzte Krebstodesfälle in Deutschland und in den USA. Auf der Abbildung sind die sieben Krebsarten mit der höchsten Mortalität A: in Deutschland im Jahr 2014 und B: in den USA im Jahr 2017 dargestellt. Die Tumorzellen der abgebildeten Krebsarten weisen eine erhöhte Produktion des CD24-Moleküls auf.^{80,81}

Somit liegt die Vermutung nahe, dass das CD24-Molekül als ein prognostischer Marker fungieren kann.^{82–93} Die Menge an dem Protein ist in Metastasen sogar höher als in Primärtumoren.^{90,91,94} Dies steht im Einklang mit der CD24-Metaanalyse von *Lee et al.* In dieser Studie wurde bewiesen, dass ein höherer CD24-Spiegel nicht nur mit der malignen Transformation der Zellen, sondern auch mit dem fortgeschrittenen Stadium der Krebsprogression assoziiert ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass CD24 das am stärksten überproduzierte Transkript in hochmetastatischen Zellen ist.⁹⁵ Pankreaskrebszellen mit dem Phänotyp CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ (*erythropoiesis stimulating agents*) haben z. B. ein 100fach erhöhtes tumorigenes Potenzial im Vergleich zu Krebszellen, die diese drei Marker nicht produzieren.⁹⁴ Bei manchen Krebsarten allerdings ist CD24 bereits in frühen Stadien der Karzinogenese überproduziert. Zum Beispiel korreliert beim hepatozellulären Karzinom die Produktion mit der Mutation des Gens für das Tumorsuppressorprotein p53 und kann hierzu als früher Tumormarker verwendet werden.^{79,89} Hinzu kommt noch, dass die erhöhte CD24-Produktion auch in den chemoresistenten Lebertumoren nachgewiesen worden ist.⁹⁶

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die vorgestellten Studien darauf hindeuten, dass das CD24-Molekül ein potenzielles Target bei der Früherkennung und

EINLEITUNG

bei der Beurteilung der Tumorprogression ist. Außerdem kann CD24 im Rahmen antimetastatischer Therapie als Zielmolekül verwendet werden und damit die Krebsbehandlung gezielt unterstützen.⁹¹ Sagiv *et al.* konnten zeigen, dass sowohl mit drei unterschiedlichen Anti-CD24-Antikörpern als auch mit Hilfe von RNA-Interferenz das Wachstum von vier Krebszellarten bis zu 90% reduziert werden kann.⁷⁹ Der resultierende lysosomale Abbau des CD24-Moleküls zeigt sich dosen- und zeitabhängig und entspricht dem CD24-Produktionslevel der Zelle.^{97,98} Durch das CD24-Targeting bei Patienten mit Blasen-Krebs konnte die Anzahl an Lungenmetastasen, welche infolge des Blasentumors gebildet wurden, signifikant reduziert werden.⁹¹

Auch die Behandlung des B-Zell-lymphoproliferativen-Syndroms mit CD24-Antikörpern führte bei einem Großteil der Patienten zu einer vollständigen Remission. Diese seltene, aber schwere Krankheit, die als Komplikation nach einer Organ- oder Knochenmarktransplantation resultieren kann, ist durch einen Mangel von zytotoxischen T-Zellen charakterisiert. Es wird angenommen, dass dieses Defizit die Transformation von B-Zellen durch eine Epstein-Barr-Virus Infektion begünstigt. Allerdings hat die Behandlung mittels Chemotherapie oder antiviraler Medikamente eine limitierende Auswirkung auf das Überleben.^{99,100} Somit könnten die CD24-Aptamere auch in diesem Zusammenhang für therapeutische Zwecke eingesetzt werden.

Bislang wurden P- und E-Selektin, Fibronectin, Kollagen I und IV, Laminin sowie LFA-1 als Interaktionspartner des CD24-Moleküls identifiziert.^{73,101–103}

Die bereits gut erforschte Wechselwirkung mit dem Integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) ist für die Zelladhäsion von Neuronen und B-Lymphozyten verantwortlich und spielt eine Rolle bei der intrazellulären Kalziumausschüttung.⁷⁰ Die Bindung mit LFA-1 lässt sich durch Erhöhung der Salzkonzentrationen nicht beeinflussen. Für die Interaktion zwischen CD24-Molekül und P-Selektin sind dagegen divalente Ionen essenziell. Gleichzeitig führt die Interaktion mit monovalenten Kationen zum Verlust der Affinität zwischen den beiden Molekülen.¹⁰⁴

Die Wechselwirkung mit den Selektinen kann eine wichtige Rolle bei der marginalen Adhäsion und Migration von Zellen im Blutstrom spielen.^{101,105} Infolge der Bindung können die CD24-produzierenden Zellen sich gezielter und leichter unter den

physiologischen Scherkräften ausbreiten und in entfernte Organe metastasieren.⁷³ Die Studien von Baumann *et al.* zeigten jedoch, dass auch die CD24-defizienten Zellen in der Lage sind, an P-Selektin zu binden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Bindung durch erhöhte CD24-Produktion auch nicht weiter beeinflusst wird.¹⁰³

Allerdings ist es immer noch unklar, infolge welcher Wechselwirkung CD24 überproduziert wird und vor allem durch welche Mechanismen das *CD24*-Gen seine onkogenen Eigenschaften entfalten kann. Deswegen ist es wünschenswert einen spezifischen und hoch affinen Binder des CD24-Moleküls zu selektieren, um die noch ungelösten Fragen zumindest teilweise beantworten zu können.

1.3.1.3 CD54 ist verantwortlich für die Blut-Gewebe-Migration von Zellen

Ein weiteres Protein, das CD54 (ICAM-1), ist entscheidend für die feste Adhäsion der Leukozyten an Blutgefäße und die Transmigration dieser Zellen in das darunter liegende Gewebe (Abb. 13). Auf diesem Weg können Immunzellen zu den Entzündungsstellen befördert werden. Aus diesem Grund wird ICAM-1 auch mit den Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht (Abb. 9).¹⁰⁶ Das ICAM-1 besteht aus fünf Domänen, die aufgrund ihrer Strukturen (β -Faltblätter) zu der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehören.¹⁰⁷ Der extrazelluläre Anteil von ICAM-1 besteht aus 453 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren, die fünf Ig-ähnliche Domänen bilden (Abb. 14). Die extrazelluläre Region ist an eine einzige hydrophobe Transmembranregion (24 Reste) und einen kurzen zytoplasmatischen Teil (28 Reste) gebunden. Jede Ig-Domäne weist eine β -Faltblattstruktur auf, die durch Disulfidbindungen stabilisiert ist.¹⁰⁷ ICAM-1 ist phosphoryliert und abhängig vom Grad der Glykosylierung bewegt sich seine Masse in dem Bereich von 80-114 kDa.^{108,109} Die Produktion erfolgt durch diverse nicht-hämatopoetische als auch hämatopoetische Zellen.¹¹⁰

EINLEITUNG

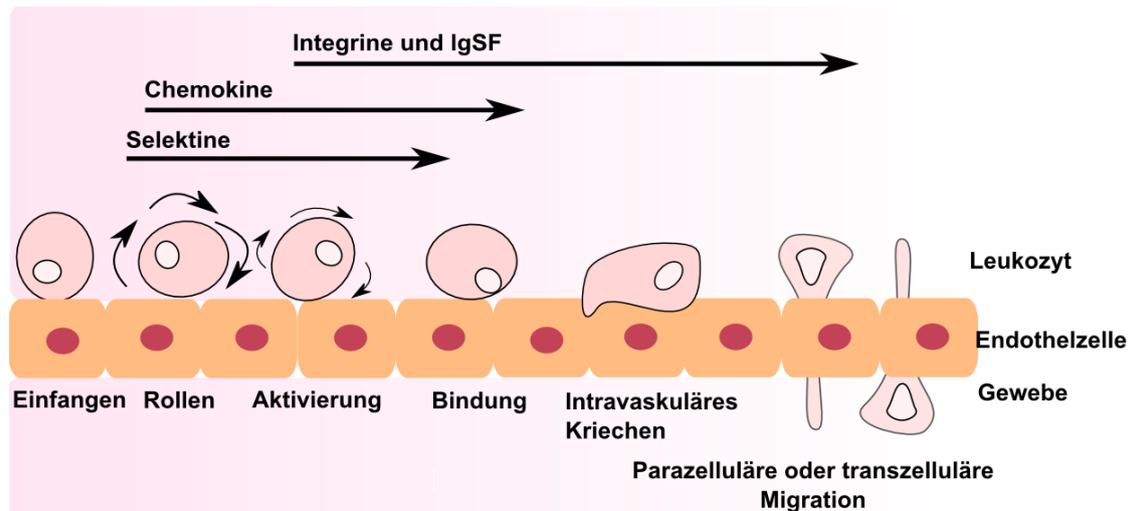


Abb. 13: Darstellung der Leukozytenmigration. Vom ersten Kontakt des Leukozyten mit den Zellen des Endothels bis hin zu seiner Migration in darunterliegende Gewebe sind viele Oberflächenmoleküle beteiligt (Selektine, Chemokine, Integrine und IgSF). ICAM-1 spielt eine Rolle bei der Bindung, dem intravaskulären Kriechen und der transzellulären Migration. Die Abbildung wurde modifiziert nach Lawson *et al.*, Ley *et al.* und Springer *et al.*^{111–113}

Dieses Transmembran-glykoprotein kann mit einer großen Anzahl an extrazellulären Molekülen wechselwirken und somit die Zell-Zell-Interaktionen stabilisieren. Außerdem hat es eine wichtige Bedeutung bei Entzündungen und Immunantworten.¹¹⁰ Zusätzlich wurde ICAM-1 mit der Progression von Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht.¹¹¹

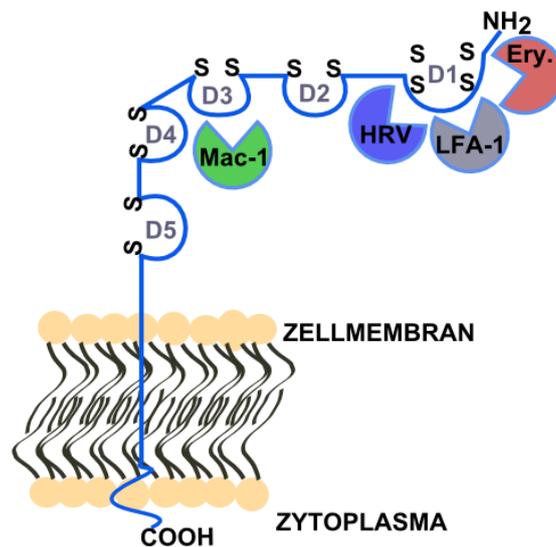


Abb. 14: Schematische Darstellung des ICAM-1-Moleküls und seinen Interaktionspartnern. Das ICAM-1-Molekül besteht aus fünf Domänen (D1-D5), die durch Disulfidbrücken stabilisiert sind (S S). Die Interaktionspartner der Domäne D1 sind farblich hervorgehoben. Blau: *Human rhinovirus* (HRV); grau: *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) und in rot: *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1* (Ery.). Die Domäne D3 interagiert mit dem in grün hervorgehobenen *Macrophage-1 antigen* (Mac-1). Die Abbildung wurden nach Lawson *et al.* modifiziert.¹¹¹

Für ICAM-1 wurden mehrere Liganden identifiziert: die membrangebundenen β 2-Integrine: LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) sowie auf den Leukozyten gebundenes Fibrinogen, Rhinoviren und die mit *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten (Abb. 14).^{108,114–121} Die Bindung an diese Blutkörperchen deutet auf die Rolle des ICAM-1-Moleküls bei Infektionskrankheiten hin. Somit kann die Hemmung der Interaktion zwischen ICAM-1 und den infizierten Erythrozyten als therapeutischer Ansatz gegen die Malaria-Erkrankung dienen.¹²²

1.3.1.4 HCT116 und HT-29-Zellen als Target für Aptamere

Sowohl die HCT116 als auch die HT-29-Zellen sind Zellen des kolorektalen Karzinoms. Der Dickdarmkrebs gehört zu den häufigsten malignen Krebsarten.^{123,124} Zur Behandlung von kolorektalen Karzinomen wird ein operativer Eingriff mit anschließender Chemotherapie durchgeführt.^{125,126} Abgesehen von den negativen Nebeneffekten der Chemotherapie ist auch ihre niedrige Spezifität bedenklich.¹²⁷ Es wurde bereits gezeigt, dass eine spezifische Freisetzung der Chemotherapeutika zur signifikanten Erhöhung der Therapeutikumseffizienz und zu einer Reduktion von Nebeneffekten führte.^{128,129} Deswegen können Aptamere, die spezifisch an Krebszellen binden, nicht nur in der Diagnostik, sondern auch als Wirkstofftransporter dienen. Zudem können sie bei Ansteuerung relevanter Bindungsstellen auch als Therapeutika *per se* eingesetzt werden (Abb. 7), da durch die Aptamere gesunde Zellen, anders als bei den Antitumor-Therapeutika, nicht angegriffen werden. Somit können die Krebszellen basierend auf ihren molekularen Charakteristika detektiert werden.⁸

1.3.1.5 Embp als Vorläufer der bakteriellen Biofilmbildung

Ein drittes relevantes Oberflächenprotein, welches als Target der Aptamere fungieren kann, ist das extrazelluläre Matrix-bindende-Protein (Embp). Embp weist eine Größe von etwa 1 MDa auf und befindet sich auf den Zelloberflächen von *Staphylococcus epidermidis*. Es besteht aus 59 FIVAR (*found in various architectures*; in verschiedenen Architekturen gefunden) und 38 G-Protein-ähnlichen Albumin-bindenden (GA) Domänen. *S. epidermidis* gehört zum einen der normalen Hautflora des Menschen an und zum anderen kann es nosokomiale Infektionen verursachen.^{130,131} Dieses opportunistische Pathogen kann z. B. Katheter oder

EINLEITUNG

künstliche Herzklappen befallen und dadurch in den Körper gelangen, wo es ein hohes Virulenzpotenzial entfalten kann.^{132,133} Hierzu zeigten Christner *et al.*, dass nur die Embp-positiven Stämme in der Lage sind, resistente, komplexe und mehrschichtige Kolonien auszubilden. Außerdem konnte bewiesen werden, dass erst die Interaktion von Embp (FIVAR-Domäne) mit der Fibronectin-Domäne-III (FNIII) des Wirts zur Ausbildung dieser Biofilme führt.¹³⁴ Neben der Antibiotika- und UV-Resistenz zeigten diese besonderen, komplexen Kolonien auch eine niedrigere Anfälligkeit gegenüber Phagozytose.^{135,136} Deswegen ist es wichtig, Wirkstoffe zu finden, die der Biofilmbildung entgegenwirken können.

Tab. 1: Vergleich der beiden rekombinanten Fragmente des Embp-Proteins. Beide Fragmente sollen für die Interaktion mit der humanen FNIII verantwortlich sein. Aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte (pI) liegt Embp125 unter physiologischem pH-Wert deprotoniert vor, während Embp170 protoniert ist.

Merkmal	Embp125	Embp170
Größe [kDa]	17	22
Strukturmerkmale	FIVAR- + GA-Module	FIVAR-Module
pI	6.23	9.22

Hierzu können Aptamere verwendet werden, die die Wechselwirkung zwischen Embp-Protein und Fibronectin inhibieren können und somit als Antagonisten agieren.¹³⁷

1.3.2 Derivatisierung von Aptameren

Die Möglichkeit, Aptamere beliebig modifizieren zu können, macht diese Oligonukleotide attraktiver als Antikörper. Seit Jahren werden Aptamere derivatisiert, um diese stabiler zu gestalten und ihre Eigenschaften gezielt auf die gewünschten Anwendungen anzupassen. Die Modifikationen können neben der Steigerung der gewünschten Eigenschaften auch der Detektion von Aptameren dienen. Durch Derivatisierung der Oligonukleotide mit den Target-affinen Spezies ist es möglich, Aptamere nicht nur effektiver zu selektieren, sondern auch welche für komplexe Zielmoleküle zu identifizieren.

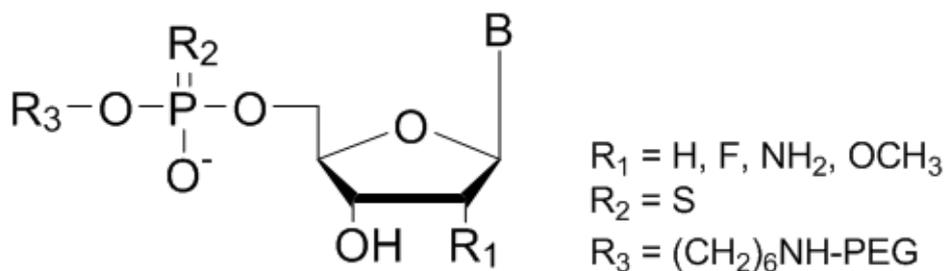


Abb. 15: Gängigste Modifikationen der Aptamere. Die Nukleinsäuren können an unterschiedlichen Positionen modifiziert werden. Eine Möglichkeit bietet das Ersetzen des 2'-Substituenten, meistens im Falle der RNA, durch eine andere funktionelle Gruppe (R₁). Dies führt zur erhöhten Beständigkeit gegenüber Nukleasen. Modifikationen können sowohl durch chemische, als auch durch enzymatische Reaktionen eingeführt werden. Desweiteren kann der Austausch von Phosphatsauerstoff gegen ein Schwefelatom (R₂) erfolgen. Außerdem werden auch Linker am 5'-Ende (R₃) mittels chemischer Synthese eingeführt, wie z. B. PEG, um pharmakokinetische Eigenschaften der Aptamere zu steigern. Auch Basenmodifikationen (B) sind möglich, wie z. B. das Einführen der Alkinfunktion mittels EdUTP in einer PCR. Weiterhin können organische Azide über eine 1,3-Dipolare Cycloaddition eingeführt werden.

1.3.2.1 Prä-selektive Modifikationen

Der Fortschritt in der DNA-Synthese führte zur Entwicklung von degenerativen Oligodesoxynukleotiden. Die Modifikationen können in einen SELEX-Pool z. B. mittels PCR eingebaut werden, unter der Voraussetzung, dass sie durch die Polymerase erkannt werden.¹³⁷

Click-SELEX

Die von Tolle *et al.* etablierte *Click-SELEX* Methode ermöglicht es, bereits vor dem Selektionsprozess eine schnelle und effektive Funktionalisierung der Nukleinsäuren durchzuführen.¹³⁸ Hierzu werden Oligonukleotide eingebaut, deren randomisierte Bereiche modifiziert sind. Desoxythymidin wird hierbei mit 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU; Abb. 16, Panel A) substituiert. Die Triphosphate dieser Nukleobasen werden von Polymerasen der Klasse B (z. B. *Pwo*) erkannt und können amplifiziert werden.¹³⁹ Die bei EdU vorhandene Alkinfunktion kann weiter vielseitig derivatisiert werden. Bei der Methode von Tolle *et al.* wurde eine Kupfer (I)-katalysierte 1,3-Dipolare-Cycloaddition durchgeführt.^{138,140} Allerdings handelt es sich hierbei um eine nicht klassische Reaktionsvariante, die nicht nur bei milden Bedingungen (25 °C und in H₂O) durchführbar ist, sondern auch zur *Click-Chemie* gehört. Diese Art der Reaktion verläuft stereoselektiv unter Bildung von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen (Abb. 16, Panel B).^{141–143} Dadurch können

1.3.2.2 Post-selektive Modifikationen

Seit Jahren wurden diverse Aptamere erst nach dem Selektionsprozess modifiziert. Die Derivatisierung soll nicht nur die Stabilität der Aptamere erhöhen, sondern auch die Detektion ermöglichen (z. B. durch Anhängen von Fluoreszenzfarbstoffen).

Spiegelmere

Spiegelmere sind L-Nukleotide der natürlich vorkommenden D-Nukleotide. Allerdings ist die Herstellung solcher Aptamere sehr aufwändig. Da diese linksdrehenden Oligonukleotide nicht von Polymerasen erkannt werden, wird erst die linksgängige Version des Targetproteins synthetisiert. Nach der Selektion des Aptamers wird sein Enantiomer generiert.^{144,145} Hierbei kann es vorkommen, dass die Faltung des Targetmoleküls durch die Synthese seines Spiegelbildes so variiert wird, dass das Spiegelmer das nativ vorliegende Zielmolekül schlussendlich nicht mehr erkennen kann.¹⁴⁶

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels unterschiedlicher SELEX-Methoden DNA-Aptamere für medizinisch relevante Zielmoleküle identifiziert werden. Dabei wurden komplexe Targetmoleküle ausgesucht, die sich auf der Zelloberfläche befinden und strukturelle Besonderheiten aufweisen, die sie zu schwierigen Oligonukleotid-Interaktionspartnern machen.

Zwei der gewählten Targets werden von eukaryotischen Zellen produziert und scheinen vor allem bei Immunkrankheiten und Metastasierungsprozessen eine relevante Rolle zu spielen. Das CD24 ist mit 32 Aminosäuren nicht nur relativ klein, sondern stellt durch seinen variablen Glykosylierungsgrad ein dynamisches und negativ geladenes Target für die Nukleinsäuren dar. Eine erhöhte Präsentation dieses Proteins auf Krebszellen geht mit einer schlechteren Heilungschance für den Patienten einher. Allerdings sind die Interaktionspartner und der genaue Wirkungsmechanismus von CD24 noch wenig erforscht. CD24 ist daher von besonderem wissenschaftlichen Interesse.

Bei CD54 (ICAM-1) handelt es sich ebenfalls um ein Glykoprotein, welches in unterschiedlichen Strukturformen (Dimerisierung) auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann. Dieses Molekül ist verantwortlich für den Extravasationsprozess.

Zusätzlich wurde ein weiteres Protein als Target ausgewählt, welches sich auf prokaryotischen Zellen befindet. Das Embp-Protein führt durch die Bindung an FNIII zur Biofilmbildung und somit zum pathogenen Verhalten des symbiotisch lebenden Bakteriums *Staphylococcus epidermidis*. Diese besondere Art der Bakterienform ist unempfindlich gegenüber allen üblichen Reinigungsprozessen und kann z. B. durch kontaminierte medizinische Werkzeuge in den Körper gelangen, wo sie eine Sepsis verursachen. Dabei spielen zwei Fragmente - Embp125 und Embp170 - eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit dem humanen Fibronectin (FNIII). Diese weisen in ihren Strukturen die sogenannten FIVAR-Domänen auf.

Deshalb ist die Inhibition der Interaktionen zwischen den Targetproteinen und deren Liganden von großem therapeutischen Interesse. Solche inhibierenden Aptamere könnten z. B. als Alternative zur Antikörper-basierten Immuntherapie eingesetzt werden. Außerdem können sie in der Diagnostik genutzt werden und zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Zielmoleküle führen. Da bisher keine

ZIELSETZUNG

gegenüber den oben genannten Targets affinen Nucleinsäuren bekannt sind, lag das Ziel dieser Arbeit in der Identifizierung und Charakterisierung der Selektionspools und der daraus resultierenden DNA-Aptamere. Hierzu sollten neben konventionellen SELEX-Methoden auch solche mit intakten Zellen (Zell-SELEX) etabliert werden, die die Selektion von Nucleinsäuren für die native Konformation der Target-Proteine ermöglichen. Verwendet wurden Kolonkarzinomazellen (HT-29 und HCT116). Die nötige Target-Spezifität sollte in der negativen SELEX mit den entsprechenden *Knockdown*-Zelllinien (CD24 kd und CD54 kd) sichergestellt werden.

Schließlich sollte für eines der Aptamere eine umfassende Analyse der Stabilität, der Struktur und der möglichen rezeptorvermittelten Endozytose in Zielzellen erfolgen.

3 Materialien

3.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind Tab. 2 zu entnehmen. Auf Grundlage der parentalen HCT116 und HT-29-Zelllinien wurden *Knockdown*-Zelllinien in der Arbeitsgruppe Schumacher (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) generiert und freundlicherweise von Tobias Lange und Daniel Wicklein zur Verfügung gestellt.

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten humanen Zelllinien.

Zellen	Eigenschaften	Bezugsquelle
HCT116 luc10	Dickdarmkrebszellen	AG Schumacher (DSMZ)
HCT116 CD54 kd	Dickdarmkrebszellen	AG Schumacher
HCT116 CD24 kd	Dickdarmkrebszellen	AG Schumacher
HT-29 luc10	Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zelllinie	AG Schumacher (DSMZ)
HT-29 CD24 kd	Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zelllinie	AG Schumacher
PC3 luc10	Prostata-Adenokarzinom-Grad-IV-Zelllinie	AG Schumacher (DSMZ)

3.2 Bakterienstämme und Vektoren

E. coli TOP10 (Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) und *E. coli* DH5 α (Genotyp: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA* *supE44* λ ⁻ *thi-1* *gyrA96* *relA1*) sowie pCRTM4-TOPO[®] TA Vektor wurden von der Firma Life Technologies (Darmstadt) käuflich erworben.

MATERIALIEN

3.3 Puffer, Medien und Lösungen

Tab. 3: In der Arbeit verwendete Puffer und Medien.

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration
AP-Substratlösung	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) Tris-Puffer MgCl ₂	0.6 mM 0.5 mM 100 mM; pH 8.5 4 mM
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol Essigsäure Bromphenolblau	25% (V/V) 10% (V/V) 0.10% (w/V)
Denat.-Probenpuffer (2 x)	Harnstoff Glycerol EDTA	8 M 10% (V/V) 20 mM
Denaturierende PAGE	Acrylamid TEMED Harnstoff in TAE-Puffer	20% 0.1% 8 M 1 x
Diffusionspuffer	C ₂ H ₇ NO ₂ SDS EDTA Mg(CH ₃ COO) ₂	500 mM 0.100% (w/V) 1.00 mM 10.0 mM
DNA-Probenpuffer (6 x)	Bromphenolblau Tris-HCl Glycerol EDTA	0.03% (w/V) 10 mM; pH 7.6 60% (w/V) 60 mM
DPBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄	137 nM 2.68 nM 1.51 nM 1.98 nM
Elutionspuffer	C ₂ H ₃ NaO ₂ EDTA SDS	0.3 M 1 mM 0.1%
Entfärber-Lösung	Essigsäure	20% (V/V)
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid-Lösung	0.4 µg/mL in 1 x TAE
Kompetitive DNAs	Heringssperma DNA IDA-Aptamer ⁶² Kompetitive DNA-Bibliothek (Tab. 9; FT2- und CS-Pool-Kompetitor)	10.0 mg/mL 100 µM 100 µM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	1 M

MATERIALIEN

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration
Luria-Bertani (LB)-Medium	NaCl Hefeextrakt Bacto-Trypton	1.0% (w/V) 0.50% (w/V) 1.0% (w/V) pH 7.3
Natriumacetat	NaOAc	3 M; pH 5.2
SDS-Laufpuffer	Tris/HCl Glycin SDS	50 mM; pH 8.3 384 mM 0.1% (w/V)
SDS-Probenpuffer (3 x)	Tris-HCl DTT SDS Bromphenolblau Glycerol	200 mM; pH 6.8 400 mM 6.0% (w/V) 0.4% (w/V) 40% (V/V)
SOC-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl ₂ MgSO ₄ Glukose	20 g/L 5.0 g/L 10 mM 2.5 mM 10 mM 10 mM 20 mM
TAE (50 x)	Tris-HCl Essigsäure (90%) EDTA	2 M; pH 8.0 2 M 5 mM
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10 mM; pH 8.0 1 mM

Die für die Zellkulturarbeiten verwendeten Puffer und Medien sind in Tab. 4 aufgeführt.

MATERIALIEN

Tab. 4: Zusammensetzung der Puffer und Medien für die Zellkulturarbeiten.

Substanz	Zugabe	Endkonzentration
Penicillin/Streptomycin	Penicillin Streptomycin	10 U/mL 10 mg/mL
Fetales Kälberserum (FKS)	FKS	gemäß Hersteller PAA Laboratories
RPMI 1640	Phenolrot L-Glutamin NaHCO ₃	gemäß Hersteller PAA Laboratories 2.0 g/L
RPMI Vollmedium	RPMI 1640 FKS PenStrep	s. o. 10% 1%
DMEM	Phenolrot L-Glutamin NaHCO ₃ Glukose	gemäß Hersteller PAA Laboratories 3.7 g/L 4.5 g/L
DMEM Vollmedium	DMEM FKS PenStrep	siehe oben 10% 1.0%
DPBS-Puffer	NaCl KCl Na ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄	137 mM 2.70 mM 6.50 mM 1.50 mM
Gefriermedium	RPMI 1640-Medium/ DMEM DMSO FKS	siehe oben 10% (V/V) 20% (V/V)
Accutase	Accutase Phenolrot EDTA	gemäß Hersteller PAA Laboratories 0.5 mM
Trypsin	Trypsin EDTA PBS	0.05% (w/V) 0.02% (w/V) 1 x

Für die elektrophoretische Analyse und Reinigung von Nukleinsäuren sowie deren Interaktionsstudien mit Proteinen wurden folgende Lösungen verwendet (Tab. 5).

MATERIALIEN

Tab. 5: Stammlösungen zur Herstellung der Polyacrylamidgele.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration
10%ige native Acrylamidstammlösung	19:1 Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung TAE TEMED	10% (w/V) 1 x 0.1% (V/V)
20%ige denaturierende Acrylamidstammlösung	19:1 Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung TAE TEMED Harnstoff	20% (w/V) 1 x 0.1% (V/V) 8 M
5-15%iger Trenngelpuffer	30% Acrylamid/ Bisacrylamid Verhältnis 37.5:1 Tris-HCl SDS	5-15% 1.5 M; pH 8.8 0.4%
4%iger Sammelgelpuffer	Acrylamid (37.5%) Tris-HCl SDS	4% 0.5 M; pH 6.8 0.4%
APS-Lösung	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	10% (w/V)
TEMED	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	1% (v/V)

Für die Selektion der Aptamere wurden die in Tab. 6 dargestellten Puffer vorbereitet. Für alle Puffer wurde ein pH-Wert von 7.4 eingestellt.

MATERIALIEN

Tab. 6: Übersicht der SELEX-Puffer, die für die targetspezifischen SELEXes verwendet wurden.

Target	SELEX-Art	Zusammensetzung
CD24	Zell-SELEX bei 4 °C	HEPES; 0-150 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂
CD24	Konventionelle (SiMAG-Beads) und Zell-SELEX mit HT-29-Zellen bei 37 °C	DPBS; 1 mg/mL BSA; 0.1 mg/mL Heringssperma
CD54	Zell-SELEX bei 37 °C	DMEM Vollmedium (FKS) DMEM-Medium
Embp170 (N-SELEX)	Konventionelle SELEX bei 37 °C	DPBS, 1 mg/mL BSA und 0.1% Tween
Embp170 (C-SELEX)	Komplementäre SELEX bei 37 °C	DPBS, 1 mg/mL BSA und 0.1% Tween
Embp125	Konventionelle SELEX (mit Konkurrenz) bei 25 °C	DPBS mit 0.25 mM MgCl ₂

3.4 Chemikalien

Die am häufigsten verwendeten Chemikalien sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Agarose	Biozym (Oldendorf)
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
BSA	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTPs	Sigma Aldrich (München)
NaCl	VWR Chemicals (Darmstadt)
KCl	Merck (Darmstadt)
LB-Medium	AppliChem (Darmstadt)
LB-Agar	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween	Sigma Aldrich (München)

3.5 Längenstandards

Die Längenstandards, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Verwendete Längenstandards.

Marker	Firma
O'GeneRuler™ Ultra Low Range Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
MassRuler™ DNA Ladder Low Range	Fermentas (St. Leon-Rot)
O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

MATERIALIEN

3.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (USA) und Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen.

Tab. 9: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
CS_fw_FITC	[FITC]ATCCAGAGTGACGCAGCA
CS_fw_Cy5	[Cy5]ATCCAGAGTGACGCAGCA
CS_fw	ATCCAGAGTGACGCAGCA
CS_rev_P	[Phos]ACTAAGCCACCGTGTCCA
CS_rev_TOPO	ACTAAGCCACCGTGTCCA
Embp EcoRI fw	CAGTGAATTCATCCAGAGTGACGCAGCA
Embp BamHI rev	TCGGGATCCACTAAGCCACCGTGTCCA
5-COMP-CS-Block	TGCTGCGTCACTCTGGAT
CS-DNA-Pool	ATCCAGAGTGACGCAGCA-N40-TGGACACGGTGGCTTAGT
CS-Pool-Kompetitor	GCCTGTTGTGAGCCTCCT-N41-GCTTATTCTTGTCTCCC
DNA170	ATCCAGAGTGACGCAGCAAAGAGCGGAGGCTTACTTACACTGTGAG TGGGTGGGCGGGTGGACACGGTGGCTTAGT
IDA	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCACCGTCATGTCCGTATTGTACCGT TGAGATTCCCACGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
FT2-fw-Cy5	[Cy5]CACGACGCAAGGGACCACAGG
FT2-fw	CACGACGCAAGGGACCACAGG
FT2-rev-P	TGCCTCTGCGGTGTCGTGCTG
FT2-Pool	CACGACGCAAGGGACCACAGG-N42- CAGCACGACACCGCAGAGGCA
FT2-Pool-Kompetitor	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNA (N= dA:dC:dG:EdU)
Adapter fw RA5	G TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCATCCAGAGTGACGCAGCA
Adapter rev RA3	CCTTGGCACCCGAGAATTCCA ACTAAGCCACCGTGTCCA
NGS Primer fw RPI	AATGATACGGCGACCACCGACAGGTT CAGAGTTCTACAGTCCGA
Index 1 (RPI1)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 3 (RPI3)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA

MATERIALIEN

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
Index 4 (RPI4)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 5 (RPI5)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 6 (RPI6)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGGCGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 7 (RPI7)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 8 (RPI8)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGTGTGACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 9 (RPI9)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATCGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 10 (RPI10)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 11 (RPI11)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 12 (RPI12)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 13 (RPI13)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 14 (RPI14)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGTGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 15 (RPI15)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 16 (RPI16)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACGGGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 17 (RPI17)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCTACGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 18 (RPI18)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGGACGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 19 (RPI19)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTACGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 20 (RPI20)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGCCACGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
Index 21 (RPI21)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAAACGTACTGGAGTTCCTT GGCACCCGAGAATTCCA
CD24A_2	ATCCAGAGTGACGCAGCATATGTGGGTGGGTGGGCGGTTATGCTGA GTCAGCCTTGCTTGGACACGGTGGCTTAGT
CD24A_5	ATCCAGAGTGACGCAGCATATGTGGGTGGGTGGGTGGTATGCTGA GTCAGCCTTGCTTGGACACGGTGGCTTAGT

MATERIALIEN

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
CD24A_19	ATCCAGAGTGACGCAGCAACAACAAAAAATGAATAAAACAAAAGA TTACAACACTCATGGACACGGTGGCTTAGT
CD24A_31	ATCCAGAGTGACGCAGCACAAAACGAAAAACAAACGACGAAATAG CCTGATTATTACTGGACACGGTGGCTTAGT
CD24A_52	ATCCAGAGTGACGCAGCATAACACACACATACCAACAGCTAACAAAC AGGAACTCGGCGTGGACACGGTGGCTTAGT
CD24A_60	ATCCAGAGTGACGCAGCAGTACTATATGTCTATTCCCTATTGTTAAT TTATATTCTTATGGACACGGTGGCTTAGT
M13R 18mer	CAGGAAACAGCTATGACC

3.7 Kommerzielle Kits und Säulen

Die verwendeten Kits und Säulen sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Verwendete Kits und Säulen.

Kit	Hersteller (Ort)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey und Nagel (Düren)
Hi Yield® Plasmid Mini DNA Isolierungskit	Süd-Laborbedarf (Gauting)
RNA Clean & Concentrator™-5	Zymo Research (Freiburg)
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	MinervaBiolabs (Berlin)
TOPO® TA® Cloning	Life Technologies (Darmstadt)
Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

3.8 Proteine und magnetische *Beads*

Die rekombinanten Proteine wurden entweder käuflich erworben oder von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

Tab. 11: Verwendete Proteine.

Protein	Hersteller (Ort)
Recombinant Human CD24 Fc Chimera, CF,	R&D systems (USA)
Recombinant Human ICAM-1/CD54	BioLegend Europe (USA)
FNIII	Henning Büttner (UKE Hamburg)
rEmbp125	Henning Büttner (UKE Hamburg)
rEmbp170	Henning Büttner (UKE Hamburg)

Die während dieser Arbeit benutzten magnetischen *Beads* sind in Tab. 12 aufgelistet.

MATERIALIEN

Tab. 12: Verwendete magnetische Beads.

Beads	Hersteller (Ort)
Dynabeads™ His-Tag Isolation and Pulldown	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
SiMAG-Carboxyl-Beads	ChemiCell (Berlin)
Dynabeads™ M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Dynabeads Protein G	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

3.9 Enzyme

Folgende Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tab. 13: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller (Ort)
Lambda Exonuclease	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
FIRE-Pol DNA Polymerase	Solis BioDyne (Tartu)
FastDigest EcoRI	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
FastDigest BamHI	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
DreamTaq Polymerase	Fermentas (St. LeonRot)
Pwo-Polymerase	Genaxxon bioscience (Ulm)
ExtrAvidin Alkaliner®Phosphatase	Sigma Aldrich (München)
DNase I (1 U/μL)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

3.10 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Verwendete Antikörper und Seren.

Antikörper	Bezugsquelle (Ort)
Purified mouse anti-human CD24	BioLegend Europe (UK)
Purified mouse anti-human CD54	BioLegend Europe (UK)
Goat anti-mouse IgG (H+L) FITC	SouthernBiotech (USA)
Goat anti-mouse IgG, F(ab') 2-APC	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Anti-rEmbp125 from mouse	BioGenes GmbH (Berlin)
Anti-rEmbp170 from rat	BioGenes GmbH (Berlin)
Anti-mouse IgG AP	Sigma Aldrich (München)
Goat anti-rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 568	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

3.11 Softwares

In dieser Arbeit wurden folgende Softwares und Web-basierte Applikationen verwendet:

Tab. 15: Auflistung der während der Arbeit verwendeten Softwares.

Software	Hersteller
Vector NTI™	Life Technologies™, (Darmstadt)
CellQuest™ Pro Software	BD Bioscience (Heidelberg)
FACSDiva™	BD Bioscience (Heidelberg)
QuantityOne®	Bio-Rad (München)
ImageLab™	Bio-Rad (München)
qPCRSoft 3.1	Analytik Jena (Jena)
Mfold	University of New York (USA)
Flowing Software	Perttu Terho (Finnland)
Inkscape	Inkscape community (USA und Kanda)
ChemBioDraw	PerkinElmer (USA)
ChromasLite	Technelysium Pty Ltd (Australien)
OriginLab®	OrinLab (USA)
MS Office	Microsoft (USA)
AdobePhotoshop	Adobe Systems (USA)
SimRNAweb	Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering (Polen)
QGRS Mapper	Ramapo College (USA)
Multalin	Florence Corpet (Frankreich)
Clustal-Omega	EMBL-EBI (UK)
bcl2fastq conversion software 2.18	Illumina (USA)
usegalaxy.org	Center for Comparative Genomics and Bioinformatics (USA)
Notepad++	Don Ho

3.12 Geräte

Tab. 16: Ausgewählte während der Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller (Ort)
Bioanalyzer 2100	Agilent (Ratingen)
CD-Spektrometer J-815 CD	Jasco (Pfungstadt)
DS-11+Spektrophotometer	DeNovix Inc. (USA)
FACSAria III	BD Bioscience (Heidelberg)
FACSCalibur	BD Bioscience (Heidelberg)
FACSCanto II	BD Bioscience (Heidelberg)
FX phosphoimager	Bio-Rad (München)
Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System	Bio-Rad (München)
Illumina HiSeq 2500	Illumina (USA)
Nano-Drop ND-1000	PeqLab (Erlangen)
PCR-Cycler Mastercycler personal Eppendorf 5331 11278	Eppendorf (Hamburg)
Professional Thermocycler	Analytik Jena (Jena)
Qubit™ 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher (Schwerte)
TRI-CARB 2500TR	Canberra Packard (Rüsselsheim)

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgte in einem humidifizierten Inkubator mit 5% CO₂ Atmosphäre bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit. Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Materialien für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden zunächst in einem Autoklaven bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert.

4.1.1 Kultivierung von adhärenenten Krebszelllinien

Die Kultivierung der adhärenent wachsenden Zellen erfolgte im supplementierten DMEM oder RPMI 1640-Medium (siehe Tab. 4). Das Kulturmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt und nach dem Erreichen von 80-90% Konfluenz wurden die Zellen geerntet und weiter passagiert. Obwohl die Zellen bis min. 40 Passagen noch vital waren und auch Targetmoleküle produzierten, wurden für die Experimente nur solche Zellen verwendet, die sich max. in der 20ten Passage befanden.

4.1.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren von Zellen wurden die konfluent gewachsenen Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen und für vier (HCT116-Zellen) bzw. 10 Min. (HT-29-Zellen) mit 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung (T25-Zellkulturflasche; Wachstumsfläche 25 cm²) für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Folgend wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Zellkulturschale gelöst und durch mehrfaches Pipettieren mit frischem Medium vereinzelt. Nach dem Zentrifugieren (2 Min. bei 500 x g) wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:10 im frischen Medium ausgesät. Um Zellsuspensionen in einer definierten Dichte zu erreichen, wurde die Zellzahl der abgelösten Zellen nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie Zellviabilität wurden die Zellen mit Trypanblau (1:1) versetzt. Die Membranen toter Zellen sind permeabel, was zur Aufnahme des

METHODEN

Trypanblaus führt. Dabei wurden die Zellen mit demselben Volumen an Trypanblau 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Volumen dieser Suspension betrug 10 μ L. Die Bestimmung der Zelldichte mittels Neubaukammer wurde mit Hilfe nachfolgender Formel berechnet.

$$\text{Zelldichte (pro mL)} = (\text{Zellzahl}/4) \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Gl. 1}$$

4.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die Dauerkonservierung von Zelllinien wurden Gefrierkulturen im Einfriermedium angelegt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.4.1 Einfrieren der Zellen

Nach Ablösen der Zellen einer konfluent gewachsenen Zellkulturschale wurden diese 2 Min. bei 500 x g und RT geerntet. Das Pellet wurde in Einfriermedium (siehe Tab. 4) aufgenommen. Hierbei wurde eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/mL eingestellt und je 1 mL in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und zunächst 15 Min. auf Eis gelagert. Die Kryoröhrchen wurden in eine auf -20 °C vorgekühlte, mit Isopropanol befüllte Einfrierbox überführt und diese in der -80 °C Truhe heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Kryokulturen bei -80 °C gelagert.

4.1.4.1 Auftauen der Zellen

Um gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen in der Hand angetaut, direkt in 5 mL vorgewärmtes Vollmedium gestürzt und für 2 Min. bei 500 x g (4 °C) zentrifugiert. Nun wurde der Medium-Überstand abgenommen, und die Zellen in 5 mL Vollmedium (RPMI + 10% FKS + 1% PenStrep) resuspendiert und in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen (1:1) mit neuem Medium versorgt.

4.1.5 Mykoplasmen-Kontaminationstest

Der Mykoplasmen-Kontaminationstest wurde mit Hilfe des Venor[®]GeM Mycoplasma Detection Kit (Tab. 10) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.6 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen und das Zell-*Sorting* erfolgten mit den FACSCalibur, FACSCanto II bzw. mit FACS Aria III Systemen der Firma Becton Dickinson (BD) Immunocytometry Systems. Hierzu wurden die Argon-Ionen-Laser (488 nm; FL-1-3) und Helium-Neon-Laser (647 nm; FL-4) verwendet. Hierbei werden die Zellen an einem fokussierten Laser vorbeigeleitet. Dadurch kommt es zur Anregung der Fluorophore und einer spezifischen Emission, welche mittels unterschiedlicher Detektoren gemessen wird. Neben der Detektion verschiedener Fluoreszenzintensitäten können über die Streuung des Laserstrahls ebenfalls Informationen über die physikalische Beschaffenheit der Zelle erhalten werden. Über das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) kann die relative Größe der Zellen ermittelt werden. Mit dem Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) ist es möglich, die Oberflächeneigenschaften von Zellen mit einem gemeinsamen Ursprung zu differenzieren. Die Signal-Auswertung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten erfolgt entweder in einem Dot Plot oder als Histogramm. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass in kürzester Zeit tausende von Zellen gemessen werden, was zusätzlich den statistischen Fehler reduziert. Bei allen Messungen wurde dabei die Spannung der *photomultiplier tubes* (PMT) von FSC, SSC und dem 660 nm Detektor konstant gehalten, um vergleichbare Messwerte zu erhalten. Die Auswertung erfolgte entweder mit der CellQuest™ Pro Software oder mit der FACSDiva™. Die resultierenden *mean fluorescence indexes* (MFI) wurden mit der Software Origin als Balkendiagramm (Tab. 16) dargestellt. Die graphische Darstellung der Histogramme und der Dot Plots wurde mit Hilfe der Flowing Software (Tab. 16) vorgenommen.

4.1.6.1 Oberflächenexpressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz

Mittels Durchflusszytometrie können einzelne Zellen (aber auch andere Partikel, wie z. B. magnetische *Beads*) basierend auf dem Vorhandensein bestimmter Proteine charakterisiert werden. Zunächst wurden die adhärenenten Zellen bei 37 °C enzymatisch von dem Kulturgefäß, wie in Kapitel 4.1.2 geschildert, gelöst. Lediglich die Inkubationszeiten wurden auf zwei (HTC116-Zellen) und sieben Minuten (HT-29-Zellen) gekürzt. Die entstandenen Zellsuspensionen (100 µL; 5×10^5 Zellen) wurden zunächst mit den primären, spezifischen (Tab. 14; 1 µL) und dann mit den

METHODEN

fluoreszenzmarkierten (100 µL; FITC- oder Cy5-modifizierten) Antikörpern (1° und 2°AK; Tab. 14; 1 µL) 30 Min. bei 4 °C oder 25 °C inkubiert. Nachdem Reste ungebundener Antikörper gewaschen waren, wurden die Zellsuspensionen für die Messung zu einem Einzel-Zell-Strahl fokussiert und durch einen Laserstrahl geleitet. Dazu wurde zunächst zweimal mittels Zentrifugation bei 500 x g für 2 Min. bei 4 °C gewaschen und in 200 µL 1 x DPBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µL des DPBS oder entsprechenden SELEX-Puffern aufgenommen. Außerdem wurde noch die Autofluoreszenz der Zellen sowie die Kreuzreaktion mit dem sekundären Antikörper (2° AK) alleine gemessen. Um tote bzw. nekrotische Zellen aus der Auswertung eindeutig ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine Probe mit 0.1% Propidiumiodid (PI) bei RT für 5 Min. inkubiert und vermessen. Die verwendeten Einstellungen sind in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Die Einstellungen der durchflusszytometrischen Messungen.

Kanal	Stärke	HCT116-Zellen	HT-29-Zellen	magnetische Beads
P1 (FCS)	Lin	E00	E00	E00
P2 (SSC)	Lin	413	350	350
P3 (FL-1)	Log	435	450	380
P4 (FL-2)	Log	435	480	330
P5 (FL-3)	Log	599	600	430
P7 (FL-4)	Log	699	730	450

4.2 Molekularbiologische Methoden

Für alle molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten wurde Nuklease- und Protease-freies Wasser verwendet.

4.2.1 Präparationen und Modifikationen der Nukleinsäuren

4.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Um die DNA *in vitro* zu amplifizieren, wurde eine PCR mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase durchgeführt. Da während dieses Prozesses Temperaturen von bis zu 95 °C erreicht werden, wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Neben der Templat-DNA wurden sog. Primer eingesetzt, die das zu amplifizierende DNA-

METHODEN

Segment flankieren. Zusätzlich können die Primer außer den komplementären Sequenzen noch weitere Basenabfolgen aufweisen, die dann gewünschte Schnittstellen, andere Bindungssequenzen oder Mutationen zum synthetisierten DNA-Strang hinzufügen. Ein PCR-Programm besteht aus drei nacheinander und maximal 40mal wiederholbaren Teilschritten, die sich in der Temperatur und Dauer voneinander unterscheiden. Zunächst wird das dsDNA-Templat denaturiert. An die so entstandene einzelsträngige DNA (ssDNA) werden durch Absenken der Temperatur Primer an die komplementären Bereiche hybridisiert. Damit dieser *Annealing*-Schritt stattfinden kann, muss die Temperatur ca. 4 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Die Schmelztemperatur (T_m) eines Primers kann mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ (in } ^\circ\text{C)} \quad \text{Gl. 2}$$

Die Schmelztemperatur wird definiert als diejenige Temperatur, bei der eine Hälfte der Moleküle einzelsträngig und die andere Hälfte doppelsträngig vorliegen.

Der Zyklus wird mit dem Elongationsschritt abgeschlossen. Dieser erfolgt bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase. In dieser Phase beginnt die Neusynthese der DNA in Richtung 5'- zum 3'-Ende. Die Zyklen werden mehrmals (siehe Tab. 18) wiederholt, so dass eine exponentielle Anreicherung der DNA erfolgt. Für die PCR wurden mehrere Komponenten zusammengegeben (Tab. 18; Tab. 19; Tab. 21; Tab. 24; Tab. 25; Tab. 26; Tab. 27; Tab. 28).

Für die Negativkontrolle während jeder PCR wurde das DNA-Templat durch ein entsprechendes Volumen an ddH₂O ersetzt. Der Erfolg der PCR wurde mit einem nativen 10%igen PAA-Gel (4.2.2) überprüft.

Tab. 18: Zusammensetzung eines 100 µL PCR-Ansatzes für die Vervielfältigung der DNA für die nächste SELEX-Runde. Die Menge an eingesetztem Templat war von dem Inkubations-Volumen der entsprechenden SELEX abhängig.

Komponente	Menge [µL]
dNTPs (2.5 mM)	8.0
PCR-Puffer inkl. 20 mM MgCl ₂ (10 x)	10
Primer-Mix (je 10 µM)	5.0
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	0.30
DNA-Templat	10-50
ddH ₂ O	ad. 100

METHODEN

Zur Modifikation der DNA mit Fluorophor (Cy5, FITC) wurde eine PCR mit einem 5'-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Vorwärts-Primer durchgeführt.

Tab. 19: Zusammensetzung eines 100 µL PCR-Ansatzes für die Fluoreszenzmarkierung (FITC/Cy5) und die Vervielfältigung der DNA. Die Menge an eingesetztem Templat variierte und wurde durch die Verfolgung des PCR-Fortschritts kontrolliert.

Komponente	Menge [µL]
dNTPs (2.5 mM)	8.0
PCR-Puffer inkl. 20 mM MgCl ₂ (10 x)	10
[5'-FITC/ Cy5] Primer-fw (10 µM)	5.0
Primer-rev-P (10 µM)	5.0
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	0.30
DNA-Templat	10-50
ddH ₂ O	ad. 100

Das Programm zur Amplifikation der DNA (Tab. 18 und Tab. 19) ist unten aufgeführt (Tab. 20).

Tab. 20: PCR-Programm für die Amplifikation der ssDNA Bibliothek. X: Zyklenanzahl, die jedem Pool neu angepasst wurde.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95	150	1
Denaturierung	95	30	} X
Annealing	56.3	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	180	1

Für die Schmelzkurvenanalyse der Nukleinsäuren wurden folgende Komponenten zusammengemischt (Tab. 21).

Tab. 21: Zusammensetzung eines 10 µL PCR-Ansatzes für die Analyse der Schmelzkurven.

Komponente	Menge [µL]
dNTPs (2.5 mM)	0.8
PCR-Puffer mit 20 mM MgCl ₂ (10 x)	1.0
Primer-Mix (10 µM)	0.5
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	0.03
DNA-Templat (25.0 pg/µL)	2.6
SYBR-Green (1:6000)	0.5
ddH ₂ O	ad. 10

METHODEN

Um die Nukleinsäuren für die Click-SELEX zu vervielfältigen, wurde der in Tab. 22 dargestellte Ansatz vorbereitet.

Tab. 22: Zusammensetzung eines 800 μ L PCR-Ansatzes für die Amplifikation der DNA für die Click-SELEX. Bei den dN*TPs wurden die dTTPs durch EdUTPs (5-Ethynyl-2'-desoxyuridintriphosphat) ersetzt.

Komponente	Menge [μ L]
dN*TPs (25 mM)	8.0
PWO PCR-Puffer mit 20 mM MgCl ₂ (10 x)	80
[5`-Cy5] Primer-fw FT2 (50 μ M)	8.0
Primer-rev-P FT2 (50 μ M)	8.0
Pwo-Polymerase (2.5 U/ μ L)	8.0
DNA-Templat	50
ddH ₂ O	638

Das Programm zur Amplifikation der DNA (Tab. 22) ist in Tab. 23 dargestellt.

Tab. 23: PCR-Programm für die Amplifikation der ssDNA Bibliothek für die Click-SELEX. Nach dem die Zyklen durchgelaufen sind, wurden die Produkte bis zur Entnahme aus dem PCR-Cycler bei 4 °C inkubiert. X: ist die Zyklenanzahl, die jedem Pool neu angepasst wurde.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	}X
Annealing	62	30	
Elongation	72	60	

Für die Analyse der Schmelzpunkte der Nukleinsäuren und der Nukleinsäurepools, wurden je 6 pg DNA-Moleküle in 10 PCR-Zyklen vervielfältigt. Im Anschluss wurden die Schmelzkurven aufgenommen. Der Temperaturgradient erfolgte zwischen 40 °C und 95 °C mit einer Heizrate von einem Grad Celsius pro 6 s (6 s Δ T 1 °C).

METHODEN

Tab. 24: Zusammensetzung eines 100 µL PCR-Ansatzes für die radioaktive Markierung (α -³²P-dTTP) und die Vervielfältigung der DNA. Bei den dNTPs wurde das dTTP durch das α -³²P-dTTP ersetzt (dN**TPs).

Komponente	Menge [µL]
dN**TPs (2.5 mM)	8.0
PCR-Puffer inkl. 20 mM MgCl ₂ (10 x)	10
Primer-fw (10 µM)	5.0
Primer-rev-P (10 µM)	5.0
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	0.30
DNA-Templat	X
ddH ₂ O	ad. 100

Das PCR-Programm, welches zum Einführen von Radionukleotiden diente, ist in Tab. 25 aufgeführt.

Tab. 25: PCR-Programm für die radioaktive Markierung der ssDNA-Pools. Nach dem die Zyklen durchgelaufen sind, wurden die Produkte bis zur Entnahme aus dem PCR-Cycler bei 4 °C inkubiert. X: Zyklenanzahl, die jedesmal neu angepasst wurde.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	150	1
Denaturierung	95	30	} X
Annealing	56.3	120	
Elongation	72	120	
Finale Elongation	72	180	1

Bei der Vervielfältigung von DNA zum Zweck der Klonierung in den Vektor pUC19 wurde folgender Ansatz pipettiert (Tab. 21).

Tab. 26: Zusammensetzung eines 50 µL Ansatzes für die Amplifikation der DNA für die Klonierung in einen pUC19-Vektor. Hierzu wurde der DNA-Pool nach der SELEX mit dem Embp125-Protein genutzt.

Komponente	Menge [µL]
dNTPs (25 mM)	1.0
PCR-Puffer mit 20 mM MgCl ₂ (10 x)	5.0
Embp EcoRI-fw (100 µM)	0.5
Embp BamHI-rev (100 µM)	0.5
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	1.0
DNA-Templat (26 pg/µL)	13
ddH ₂ O	ad. 50

Bei der weiteren Klonierungstechnik (TOPO-TA) wurde die in Tab. 27 dargestellte Zusammensetzung vorbereitet.

METHODEN

Tab. 27: Zusammensetzung eines 50 µL Ansatzes für die Amplifikation der DNA für die TOPO-TA Klonierung.

Komponente	Menge [µL]
dNTPs (25 mM)	1.0
PCR-Puffer mit 20 mM MgCl ₂ (10 x)	5.0
CS_fw Primer (100 µM)	0.5
CS_rev_TOPO Primer (100 µM)	0.5
FIRE-Polymerase (5 U/µL)	1.0
DNA-Templat (26 pg/µL)	13
ddH ₂ O	ad. 50

Das PCR-Programm für die TOPO-TA-Klonierung ist in Tab. 28 aufgeführt.

Tab. 28: PCR-Programm für die Klonierung der Selektionspools mittels TOPO[®]-TA Cloning[®] Kit.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	150	1
Denaturierung	95	30	} 10-12
Annealing	56.3	30	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	900	1

Bei dem weiteren Ansatz (Tab. 29) handelt es sich um die Vervielfältigung der DNA für die NGS-Analyse.

Tab. 29: Zusammensetzung eines Ansatzes für die Pool-Amplifikation für die NGS.

Komponente	Menge [µL]	Finale Menge
dNTPs (25 mM)	0.5	0.25 mM
Pwo PCR-Puffer mit 20 mM MgCl ₂ (10 x)	10 x	1 x
Primer-fw (50 µM)	0.5	500 nM
Primer-rev (50 µM)	0.5	500 nM
PWO-Polymerase (2.5 U/µL)	0.5	2.5 U
Templat (26 pg/µL)	26	
ddH ₂ O	ad. 50	

METHODEN

Tab. 30: Temperatur-Programm einer PCR für die Vorbereitung der DNA-Pools für NGS.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	} 12-20
Annealing	60	30	
Elongation	72	15	
Finale Elongation	72	300	1

4.2.1.2 Hydrolyse mittels Lambda-Exonuklease

Um die einzelsträngige DNA aus der nach der PCR doppelsträngig vorliegenden DNA zu erhalten, wurde ein enzymatischer Abbau des Folgestrangs durchgeführt. Hierzu wird die Lambda Exonuklease (λ -Exonuklease) genutzt, die es ermöglicht, dass der abzubauen Strang am 5'-Ende mit einem Phosphat markiert ist. Die benötigte Modifikation wird zunächst in einer PCR (4.2.1.1) unter Verwendung eines 5'-phosphorylierten *reversen* Primers eingefügt. So generierte DNA kann dann durch die Hydrolyse der Phosphordiesterbindung (5' \rightarrow 3' Exodesoxyribonuklease) degradiert werden. Der Erfolg des Abbaus wurde nach der elektrophoretischen Trennung und der Detektion der Nukleinsäuren im UV- (Ethidiumbromid) oder VIS-Bereich (520 nm SYBR-Green, 488 FITC, 647 nm Cy5) kontrolliert (4.2.2). Dabei kommt es bei erfolgreichem Abbau des Folgestranges zu Veränderungen im Laufverhalten im Vergleich zum dsDNA-Eddukt aufgrund des geringeren Molekulargewichts.

Tab. 31: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur enzymatischen Strangtrennung. Der Erfolg des Abbaus wurde mittels PAGE kontrolliert. Bei unvollständiger Hydrolyse wurde mehr Enzym zugesetzt und die Inkubationszeiten wurden erhöht.

Komponente	Finalmenge
dsDNA	100 pmol
Lambda Exonuklease-Puffer (10 x)	11 μ L
Lambda Exonuklease (10 U/ μ L)	5.00-27.5 U
ddH ₂ O	ad. 110 μ L

4.2.1.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren

Um die Oligonukleotide mit γ -[³²P]-ATP radioaktiv zu markieren, wurde die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 32

METHODEN

aufgelistet. Die einzelsträngige DNA wurde entweder kommerziell erworben oder mittels λ -Exonuklease Abbau (4.2.1.2) generiert.

Tab. 32: Zusammensetzung der Reagenzien für die radioaktive 5'-Endmarkierung der DNA.

Reagenz (Konz.)	Volumen [μ L]	Finalmenge
T4 PNK (10 U/ μ L)	1	1 U
T4 PNK Buffer (10 x)	2	1 x
ssDNA (10 μ M)	10	10 pmol (500 nM)
γ - 32 P]-ATP	3	10 pmol
ddH ₂ O		ad. 20 μ L

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 60 Min. inkubiert und anschließend einer Isopropanolpräzipitation (4.2.2.5) und Reinigung mittels 10%iger denat. PAGE (4.2.2.3) unterzogen, um die nicht inkorporierte γ - 32 P]-ATP abzutrennen. Nach der Diffusionselution wurden die γ - 32 P]-Oligonukleotide weiter mit Hilfe von Silikasäulen (4.2.2.4 a) prozessiert und anschließend mittels 10%iger PAGE (4.2.2.1 a) auf die Qualität der DNA hin analysiert.

Für die (Rück-)Faltung der DNA wurden die Nukleinsäuren zunächst bei 95 °C für 3 Min. denaturiert und danach entweder langsam auf 37 °, 25 ° oder 4 °C gebracht. Dieses Programm wurde vor jeder SELEX-Inkubation sowie auch vor jedem Experiment angewendet, um homogene Faltungsbedingungen zu gewährleisten. Der Verlauf des Temperaturprogramms ist in Tab. 33 dargestellt.

Tab. 33 Temperaturprogramm zur Denaturierung und Renaturierung des Nukleinsäurepools.

Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]
95	3	40	5
85	3	35	5
75	3	30	5
70	3	25	5
65	5	20	5
60	5	15	5
55	5	10	5
50	5	4	∞
45	5		

4.2.2 Analytische Trennung und Reinigung der Nukleinsäuren

4.2.2.1 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich die Nukleinsäuren aufgrund ihrer Polyanionseigenschaften im elektrischen Feld der Größe nach trennen. Bei der Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren spielt auch die Porengröße der verwendeten Matrix (Polyacrylamid oder Agarose) eine entscheidende Rolle. Durch das Auftragen eines Standards lassen sich die Größen ermitteln (nt oder bp) und unter der Verwendung von speziellen Markern (Tab. 8) die Konzentration der Nukleinsäurelösungen analysieren.

a. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei den Polyacrylamidgelen handelt sich um ein Kopolymer von Acrylamid und N,N'-N,N'-Methylenbisacrylamid, welches erstmals 1959 von Raymond und Weintraub für eine Elektrophorese von Nukleinsäuren eingesetzt wurde.¹⁴⁷ Als Initiator der Polymerisationskettenreaktion diente das Ammoniumperoxydisulfat (APS), da dieses in wässriger Lösung freie Sulfatradikale bildet. Diese greifen die Doppelbindung der verknüpften Kohlenwasserstoffatome elektrophil an. Das N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient dabei als Katalysator der Polymerisationskettenreaktion. Für die Analyse der Nukleinsäuren wird der Gelmatrix zusätzlich Harnstoff zugesetzt (Tab. 5; 4.2.2.1), um die Nukleinsäuren während der Elektrophorese gegebenenfalls denaturiert zu halten. Bei den Polyacrylamidgelen wurden Gele mit den Maßen 75 x 85 x 0.75 [mm] verwendet.

Native PAGE

Für die Analyse sowie zur Reinigung von dsDNA wurde eine native 10%ige PAGE durchgeführt. Bei den *Gelshifts*assays wurden dagegen 5%ige Gele benutzt. Hierzu wurde eine 10%ige Stammlösung angesetzt (Tab. 5), die durch Zugabe von 360 µL 10%iger APS-Lösung und 36 µL TEMED zum Gel polymerisieren kann. Durch vorheriges Verdünnen der Stammlösung mit TAE-Puffer können z. B. 5%ige Gele hergestellt werden. Vor der Elektrophorese wurde die DNA mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in einem 1 x TAE-Laufpuffer bei RT und 160 V getrennt. Bei einem *Gelshifts*assay wurde die Elektrophorese bei 4 °C und 30 V durchgeführt. Die

METHODEN

Detektion der Nukleinsäurefragmente erfolgte entweder im UV-Bereich (EtBr bzw. SYBR-Gold), durch den vorhandenen Fluorophor (Cy5 bzw. FITC) oder autoradiographisch, wenn die Nukleinsäuren radioaktiv markiert vorlagen.

Denaturierende PAGE

Um eine Entfaltung von Molekülen zu gewährleisten, wurden für die Reinigung und Analyse der einzelsträngigen Oligonukleotide (ssDNA) denaturierende Acrylamidgels verwendet. Hierzu wird zunächst die 20% denaturierende Stammlösung (Tab. 5) vorbereitet. Durch das weitere Verdünnen mit 8 M Harnstofflösung in TAE-Puffer wurden z. B. 10%ige Gele vorbereitet. Hierzu wurden 36 mL Acrylamidlösung mit 360 µL 10%iger APS-Lösung und 36 µL TEMED versetzt. Die PAGE wurde im 1 x TAE-Laufpuffer bei 8 W (analytische PAGE) oder bei 20 W (präparative PAGE) durchgeführt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen an 2 x denat. Probenpuffer versetzt und für zwei Minuten bei 90 °C denaturiert.

b. Agarosegel-Elektrophorese

Mittels der Agarosegel-Elektrophorese ist es möglich, Nukleinsäurefragmente der Größe nach zu trennen. Hierzu wurde die gewünschte Menge an Agarose (0.8-2.0% (w/V), TAE-Puffer) in Elektrophoresepuffer gekocht. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses beladen und bei 140 V wurden die Nukleinsäuren getrennt. In dieser Arbeit wurden 1%ige (w/V), native Agarosegele angefertigt, um die DNA mit der Länge von 0.5 bis 1.1 bp zu analysieren. Als Laufpuffer diente hier 1 x TAE (Tab. 3). Die Proben wurden mit 1/6-Volumen an 6 x DNA-Probenpuffer (Tab. 3) versetzt und elektrophoretisch bei 140 V getrennt.

4.2.2.2 Detektion der Nukleinsäuren in den PAA- und Agarosegelen

Um Nukleinsäuren nach der Trennung im elektrischen Feld zu analysieren, wurden sie entweder mittels Ethidiumbromid oder SYBR-Gold-Färbung (s. u.) visualisiert. Außerdem wurde die DNA auch anhand der Absorption des kovalent-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5 und FITC) oder nach der radioaktiven Markierung durch Autoradiographie (4.2.1.3) detektiert.

Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid-Färbung

Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid. Hierbei handelt es sich um ein Derivat des Dimidiumbromids, welches zu den kationischen, heterozyklischen Fluoreszenzfarbstoffen gehört und zur Detektion von RNA und DNA verwendet wird. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad für fünf Minuten inkubiert. Dieser rote Phenanthridin-Farbstoff interkaliert in die Nukleinsäuren und verschiebt deren Absorptionsspektrum im UV-Bereich. Zur Detektion wurden die Nukleinsäuren mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm angeregt. Die Detektionsgrenze in Polyacrylamidgelen liegt dabei bei ~50 ng/mm.^[42] Dabei ist die Leuchtintensität der Konzentration sowie der Länge der Nukleinsäure proportional.^[38]

Nachweis von Nukleinsäuren mittels SYBR-Gold-Färbung

Hierzu wurden die Gele 10 Min. in einer SYBR-Gold-TAE-Lösung (1:1000; 3 µL/30 mL) inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion in einer Geldokumentationsanlage (Tab. 16).

Autoradiographie zum Nachweis der ³²P-markierten Nukleinsäuren

Die Visualisierung der radioaktiv markierten Oligonukleotide erfolgte mittels des FX phosphorimager der Firma Bio-Rad (Tab. 16). Hierzu wurden entweder die PAA-Gele oder eine Membran (Nylon- oder Nitrocellulosemembran) mit einem *Phosphorscreen* für 1 Min. bis 24 h inkubiert.

4.2.2.3 Gelreinigung: Extraktion der Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Hierzu wurden die Nukleinsäuren auf ein 10%iges denat. PAA-Gel aufgetragen und bei 20 W elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte mittels *UV-Shadowing* oder Autoradiographie. Die Gelstücke wurden entsprechend ausgeschnitten und mit 400 µL Elutionspuffer (Tab. 3) versetzt und für 60 Min. bei 50 °C und 1000 rpm inkubiert. Das Eluat wurde von dem Gel durch Abpipettieren getrennt und mit Ethanol bzw. Isopropanol, wie in 4.2.2.5 beschrieben, gefällt.

4.2.2.4 Elution der gewünschten Oligonukleotide aus PAA- oder Agarosegelen

a. Mittels kommerzieller Kits

Nach dem Visualisieren der Nukleinsäuren (4.2.2) auf der verwendeten Gelmatrix wurden die Oligonukleotide ausgeschnitten und weiter nach Herstellerangaben (Tab. 10: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up oder Machery und Nagel) gereinigt. Die Nukleinsäuren wurden entweder in ddH₂O, in einem SELEX-Puffer oder in Probenpuffer (Tab. 3) aufgenommen.

b. Mittels Diffusionselution aus PAA-Gelen

Um die Nukleinsäuren aus den PAA-Gelen zu isolieren, wurden die Gelfragmente ausgeschnitten, welche die gewünschten Oligonukleotide beinhalteten. Nach dem Fragmentieren wurden die Gelstücke mit Diffusionspuffer (Tab. 3) überschichtet und die DNA wurde bei 37 °C und 1400 rpm eluiert. Im Anschluss erfolgte eine Alkoholpräzipitation.

4.2.2.5 Alkoholpräzipitation

Ethanol und Isopropanol verringern die Löslichkeit von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen. Somit lassen sich die Nukleinsäuren aus der Lösung fällen und konzentrieren. Zunächst wurde das Nukleinsäurehaltige Eluat mit 1/10 V an Natriumacetat (0.3 M, pH: 5.2) versetzt. Dann wurde die Lösung mit 2.5fachem V an 100%igem kaltem Ethanol (-20 °C) bzw. dem gleichen Volumen an kaltem Isopropanol (-20 °C) versetzt. Die Fällung wurde über einen Zeitraum von 30 Min. bei -20 °C vervollständigt. Die Ansätze wurden dann 30 Min. bei 4 °C und 16100 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch erneute fünfminütige Zentrifugation mit 200 µL 70%iger Ethanollösung (-20 °C) weiter gereinigt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Nukleinsäuren an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 50 µL ddH₂O resuspendiert.

4.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheitsbestimmung erfolgte mit drei unterschiedlichen Methoden: photometrisch, spektrometrisch und mittels eines Bioanalyzers.

METHODEN

4.2.3.1 Photometrisch mittels NanoDrop oder DeNovix

Die Eigenschaft von aromatischen Ringen bei 260 nm zu absorbieren, kann für die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren genutzt werden. Hierzu wurde das NanoDrop ND 1000 oder das DS-11 + Spektrophotometer DeNovix (Tab. 16) benutzt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte dann nach dem Lambert-Beer Gesetz, wie unten dargestellt.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \qquad \text{Gl. 3}$$

In der Gleichung 3 sind:

A: Absorption als Quotient der eingestrahnten und transmittierten Lichtintensität;

ϵ : Molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$];

c: Molare Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$];

d: Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit [cm].

Für die Bestimmung galten folgende Zusammenhänge:

- $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht:
- 50 ng- cm/ μL doppelsträngiger DNA;
 - 33 ng- cm/ μL einzelsträngiger DNA.

Die Grundlinienkorrektur des Absorptionsspektrums erfolgte bei 340 nm. Bei der Konzentrationsbestimmung über den Fluoreszenzfarbstoff wurden folgende Extinktionskoeffizienten (ϵ) verwendet:

Tab. 34: Übersicht der Extinktionskoeffizienten der verwendeten Fluorophore.

Fluorophor	ϵ [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	Wellenlänge [nm]
Cy5	250000	650
FITC	71000	488

Die Reinheit der Nukleinsäurelösungen setzt sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260/280 nm sowie 260/230 nm zusammen. Im ersten Fall sollte der Absorptionskoeffizient idealerweise für die DNA bei 1.8 und für RNA bei 2.0 liegen. Der Wert des zweiten Verhältnisses sollte zwischen 1.8 und 2.2 liegen.

Qubit™-Fluorometer

Die Quantifizierung der DNA, RNA oder Proteine erfolgte fluorometrisch und individuell für jede Molekülklasse. In dieser Arbeit wurde das Kit Qubit 1 x dsDNA HS Assay

METHODEN

(Tab. 10) verwendet und es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Der Vorteil gegenüber photometrischen Messungen ist hierbei die Genauigkeit der Ergebnisse in Lösungen unter 100 ng/μL. Hinzu kommt noch, dass bei Qubit™ auch heterogene Lösungen gemessen werden, da nur die spezifisch adressierten Nukleinsäuren erfasst werden. Vor jedem Assay muss eine Kalibrierungsmessung durchgeführt werden. Die Konzentration wird mit Hilfe folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Proben Konzentration} = \text{QF-Wert} \cdot 200 \cdot x^{-1} \quad \text{Gl. 4}$$

In der Gleichung 4 sind:

Proben Konzentration [ng/mL];

QF-Wert: Gemessener Wert der Fluoreszenzintensität;

x: Probenvolumen.

Bioanalyser

Mit Hilfe der automatischen Elektrophorese-Technik des Bioanalyzers können die Konzentration, Größe und Qualität der Biomoleküle einer Klasse in einem Analyten bestimmt werden. Die Analyse erfolgt durch den Vergleich mit einem Referenzmaterial. Die von dem Hersteller angegebene Genauigkeit hängt mit dem Laser zusammen und erlaubt die Detektion von bis zu 0.1 ng des Biomoleküls. Hierzu wird mit Hilfe des DNA High Sensitivity Kit (Tab. 10) der Chip nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Ergebnisse werden als Elektropherogramme (Peaks) und mit Hilfe des Dichteplots analog wie Gelbilder (Banden) dargestellt.

4.2.4 Klonierungstechniken

Bei der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei Klonierungstechniken verwendet. Nach der Selektion für das Embp125-Protein wurde eine gerichtete Klonierung mit Hilfe von BamHI und EcoRI-Schnittstellen durchgeführt. Bei der zweiten Methode wurde die kommerzialisierte Methode der TOPO-TA-Klonierung verwendet.

4.2.4.1 Klonierung mittels Schnittstellen

a) Restriktion des Vektors pUC19

Die DNA-Amplifikationsprodukte aus der letzten SELEX-Runde für das Embp125 Protein wurden in den Vektor pUC19 (12.4) kloniert. Hierzu wurde der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnitten (Abb. 17).

METHODEN

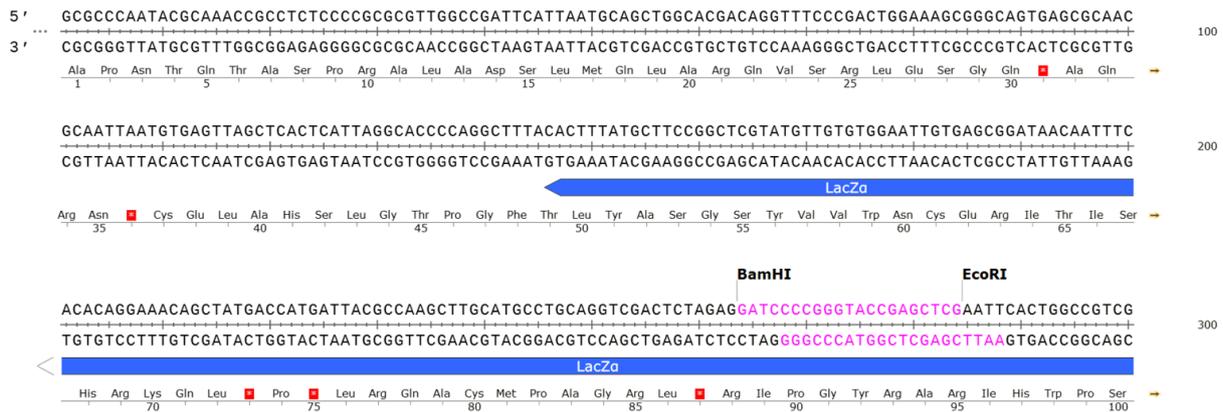


Abb. 17: Darstellung der verwendeten Schnittstellen des pUC19-Vektors. Zu sehen ist der 300 bp lange Ausschnitt des 2986 bp langen Plasmids. Für die Klonierung des DNA-Pools nach der letzten SELEX-Runde für das Target Embp125 wurde der Vektor pUC19 sowie die Insert-DNA mit den Enzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Das ausgeschnittene Fragment (in Magenta) kann durch ein neues Insert mit Hilfe von *Sticky-End*-Ligation ersetzt werden.

In Abb. 17 ist ein Abschnitt der pUC19-Vektor-Sequenz dargestellt. Die in magenta markierte Sequenz wird bei der Restriktion entfernt.

Tab. 35: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 37 °C.

Komponente	Volumen [µL]
pUC19 (10 ng/µL)	10
10 x FastDigest Green Puffer	5.0
FastDigest EcoRI	1.0
FastDigest BamHI	1.0
ddH ₂ O	ad. 50

Ein so linearisiertes Plasmid (Tab. 35) kann wieder mit einem passenden Fragment ligiert werden. Dies erfolgt gerichtet mit Hilfe der beim enzymatischen Abbau erzeugten Überhänge (*Sticky ends*). Das Insert wurde vorab in einer PCR (Tab. 9, Tab. 26) um die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen verlängert.

b) Ligation des Inserts und des Vektors pUC19

Die Ligation des geschnittenen Vektors pUC19 (100 ng; Tab. 35) erfolgte mit einem molaren Überschuss (5:1) an dem analog geschnittenen PCR-Produkt (Tab. 26). Die beiden restringierten DNA-Moleküle wurden mit T4-DNA-Ligase (1 U), sowie mit 1/10 V an 10 x T4-Ligase Puffer versetzt. Der Ansatz wurde für 16 h bei 16 °C

inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation der *E. coli*-Zellen durch Inkubation mit der rekombinanten DNA (3.2). Die Vektorkarte ist in Abb. 92 dargestellt.

4.2.4.2 TOPO[®] TA Cloning[®]

Mit Hilfe des TOPO[®] TA[®] Cloning Kits ist es möglich PCR-Produkte effizient in einen Vektor einzubringen. Bei dieser Klonierungsmethode wird die Transferaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase genutzt, wodurch ein Desoxyadenosinmonophosphat an das 3'-Ende der DNA angefügt wird. Diese Überhänge werden mittels DNA-Topoisomerase I (*Vaccinia Virus*) mit den überhängenden Desoxythymidinresten des Vektors pCR[™]4-TOPO[®] TA (Abb. 93) des TOPO TA Cloning[®] Kits (Tab. 10) kovalent verknüpft. Die Klonierungsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben. Das PCR-Programm sowie die Zusammensetzung für die Amplifikation der zu ligierenden DNA sind in Abschnitt 4.2.1.1 zu finden (Tab. 28, Tab. 27). Die Ligationsansätze wurden vorbereitet und es wurde entweder mit 0.5 oder 4 µL des frischen Amplifikations-Produktes nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.2.5 Übertragung des genetischen Materials in die Bakterien-Zellen

4.2.5.1 Elektroporation

a) Herstellung von *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

Die *E. coli* TOP10-Zellen (3.2) für die Übertragung des genetischen Materials wurden mit der Methode nach Dower *et al.* vorbereitet. Die aus der Vorkultur angeimpften Tageskulturen (400 mL) wurden bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0.6 (OD600) kultiviert. Die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase wurden direkt im Eisbad abgekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C. Die Zellen wurden bei 3000 x g für 15 Min. geerntet. Nach zweifachem Waschen mit 50 mL und zweimal mit 25 mL ddH₂O (4 °C) wurden diese für 15 Min. pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL 10%igem Glycerin resuspendiert. Je 100 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

b) Übertragung des genetischen Materials mittels Elektroporation

Ein Aliquot (100 µL) der so präparierten *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Die Zelllösung wurde mit 5 µL des Klonierungsansatzes (4.2.4.1) versetzt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Übertragung des rekombinanten genetischen Materials erfolgte bei 1.8 kV. Durch die Zugabe von 450 µL vorgewärmtem (37 °C) SOC-Medium wurden die Zellen vorsichtig aus der Küvette herausgespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die Regeneration und Resistenzausbildung wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Zellsuspensionen (25-150 µL) wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ausplattiert, welche lediglich mit dem entsprechenden Volumen an ddH₂O unter den gleichen Bedingungen transformiert wurden. Es wurden 100 µL der Suspension auf eine Platte aufgetragen und der Rest wurde durch Zentrifugation eingeeengt und komplett auf eine zweite Platte aufgetragen.

4.2.5.2 Hitzeschock

a) Herstellung von *E. coli* Zellen für die DNA-Übertragung mittels Hitzeschock

Hierzu wurden *E. coli* DH5α-Zellen (3.2) verwendet. Bei dem Hitzeschock entstehen Poren in der Bakterienmembran. Die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen der Plasmid-DNA und der bakteriellen Zellmembran werden durch die Calciumionen ausgeglichen. Auf diesem Weg gelangt die DNA in die Zellen. Hierzu wurden 3 mL LB-Medium mit Bakterien beimpft und für 16 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 1 mL der Übernachtskultur in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, für 10 Min. auf Eis gestellt und anschließend für 5 Min. bei 5000 x g geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 200 µL CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension ein weiteres Mal bei 5000 x g zentrifugiert und nach dem Resuspendieren für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in je 100 µL Aliquot mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

b) Übertragung von DNA in *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock

Hierzu wurden 100 µL der so vorbereiteten Zellen 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe der DNA und das Homogenisieren des Gemisches. Dann wurden die Zellen weitere 45 Min. auf Eis inkubiert und für eine Minute einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Anschließend wurden die Bakterien weitere 5 Min. auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 900 µL SOC-Medium eine Stunde bei 37 °C und 900 rpm geschüttelt. Es wurden 100 µL der Suspension auf eine Platte aufgetragen und der Rest wurde durch Zentrifugation eingengt und komplett auf eine zweite Platte gegeben.

4.2.5.3 Blau-Weiß-Screening

Mit der Methode der Blau-Weiß-Selektion ist es möglich, bakterielle Kolonien zu identifizieren, die ein Transgen enthalten. Dabei werden nur Bakterienstämme verwendet, die selbst über kein weiteres Gen für eine β -Galactosidase verfügen. Als DNA-Vektoren werden Plasmide verwendet, die an der Position der Insertion das Gen des α -Peptids der β -Galactosidase (*lacZ α* -Gen) tragen. Beim erfolgreichen Einbringen des Reporter-Gens wird kein α -Peptid produziert; die α -Komplementierung der vom Wirt produzierten inaktiven β -Galactosidase-Variante kann nicht erfolgen – die Zellen zeigen somit einen β -Galactosidase-negativen Phänotyp. Dadurch können die transgenen Zellen X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) nicht spalten, der blaue Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) kann somit nicht entstehen und die Kolonien bleiben weiß. Hierzu wurden 50 µL IPTG (500 mM in H₂O) mit 20 µL an X-Gal (240 mM in N,N-Dimethylformamid) und 30 µL ddH₂O versetzt, gleichmäßig auf die LB-Agar-Platten (Tab. 7) aufgetragen und bei 37 °C getrocknet. Die Bakteriensuspensionen wurden auf die Platten gegeben und anschließend weitere 16 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Bakterienkolonien auf deren blaue oder weiße Färbung untersucht und entsprechend für die Anzucht als Übernachtskulturen weiterverwendet. Es wurden je 3 mL des LB-Mediums mit Ampicilin (50 mg/L) vorbereitet und nach dem Inokulieren weiter kultiviert. Nach der Vermehrung der Bakterien erfolgte am nächsten Tag die Isolierung der Insert-tragenden Plasmide.

4.2.5.4 Kolonie-PCR

Hierzu wurden je 15 µL ddH₂O mit der gewünschten Kolonie beimpft. Danach erfolgte eine PCR mit je 2 µL dieser Bakterien-Suspension (Tab. 18). Abhängig von der Insert-Ausrichtung wurden hierzu zwei Primer-Paar-Kombinationen verwendet (M13R 18mer und CS_fw/ CS_rev, Tab. 9). Das PCR-Programm (Tab. 20) wurde für 19 Zyklen durchgeführt. Es wurden Produkte mit einer Größe von 167 bp erwartet. Bei den Amplifikationsprodukten handelte es sich um die selektierten Oligonukleotide. Diese wurden um 91 nt aus dem Vektor und um die Sequenz M13 verlängert, welche für die Sequenzierung nach Sanger wichtig war. So konstruierte PCR-Produkte lieferten zum einen den Nachweis für das Vorhandensein des gewünschten Inserts (4.2.2.1a), zum anderen ermöglichten sie die Sequenzierung (4.2.7.1).

4.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* TOP10-Zellen erfolgte mit Hilfe des Hi Yield Plasmid Mini-DNA-Kits (Tab. 10) nach Herstellerangaben. Die gereinigten DNA-Lösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.7 Sequenzierungsmethoden

4.2.7.1 Sequenzierung nach Sanger (GATC)

Um die Insert-Sequenzen in den isolierten Vektoren aufzuklären, wurden die Plasmide über den M13-Überhang des Primers nach Sanger von der Firma GATC sequenziert.⁵⁰ Die Daten wurde mit Hilfe von Chromas 2 und VectorNTI (Tab. 15) ausgewertet.

4.2.7.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Für die NGS-Analyse wurden die ausgesuchten DNA-Pools zunächst mit den Illumina-Adapter-Sequenzen versehen (Abb. 18). Dies erfolgte unter Verwendung von zu diesem Zwecke extra entworfenen Primern (Adapter fw RA5 und Adapter rev RA3-Primer Paar; Tab. 9; Tab. 29) mittels einer PCR. In einer zweiten PCR wurden die entsprechenden Indizes (NGS fw Primer RPI und Index1-21 rev Primer RPI1-21; Tab. 9; Tab. 29) eingefügt. Anhand dieser Indizes kann zwischen den DNA-Pools unterschieden werden. Basierend auf empirischen Daten anderer Mitarbeiter wurde

METHODEN

Index Nummer 2 nicht verwendet, somit trug die letzte von 20 DNA-Bibliotheken den Index mit der Nummer 21.

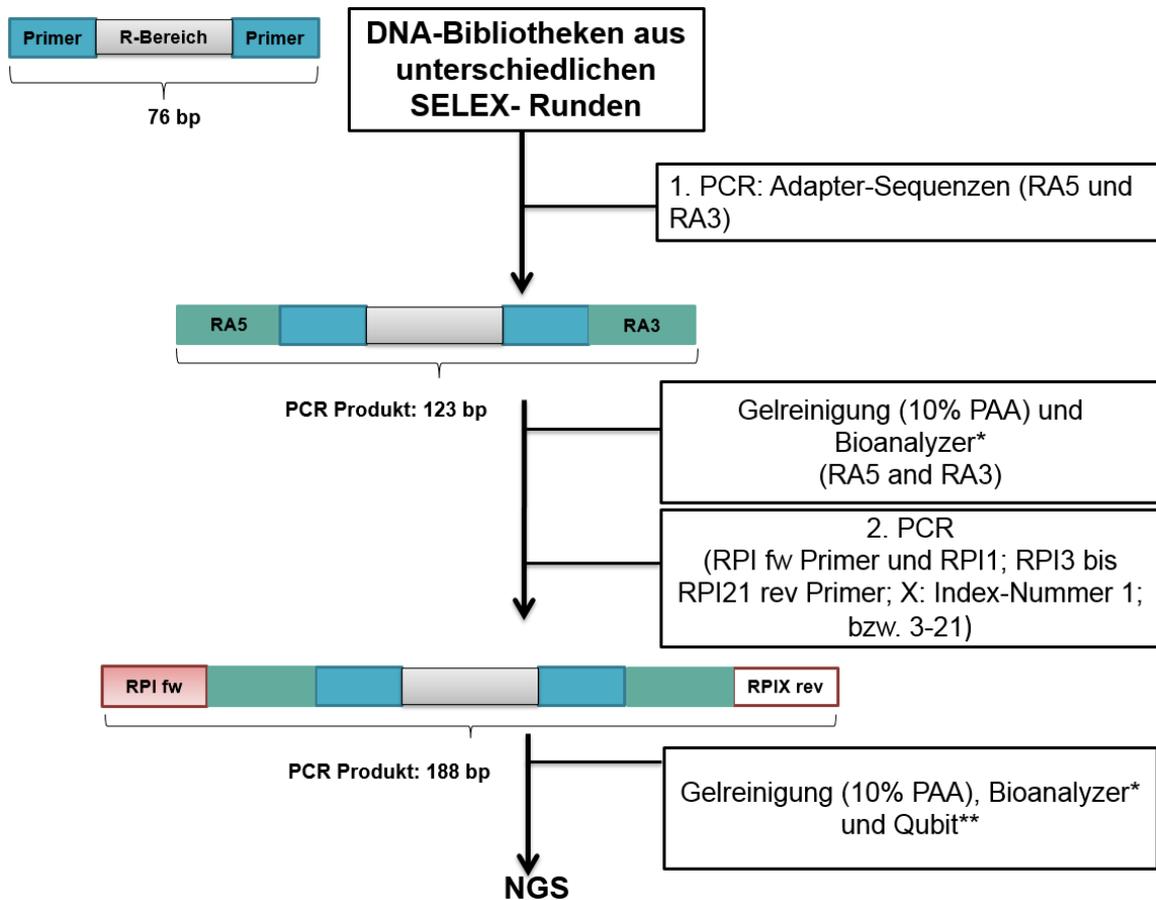


Abb. 18: Darstellung der Methode zur Generierung von DNA-Pools für die NGS-Analyse. Hierzu wurden die DNA-Stränge (76 bp) aus den ausgesuchten SELEX-Runden zunächst mit den Adaptoren versehen. Die resultierenden Produkte (123 bp) wurden nach der Gelreinigung in einer zweiten PCR mit unterschiedlichen Indizes am 3'-Enden versehen. Diese 188 bp großen Produkte wurden nach der Gelreinigung qualitativen (*) und quantitativen (**) Analysen unterzogen und anschließend mittels eines HiSeq-Gerätes sequenziert.

Nachdem das PCR-Programm beendet wurde (Tab. 30), wurden je 2 μ L des Produktes mittels PAA-Gelelektrophorese (4.2.2.1a) untersucht. Wenn die PCR-Zyklen (12 Zyklen) keine ausreichende Menge des Produktes lieferten, erfolgten zusätzliche PCR-Zyklen (bis maximal 20). Dabei wurden nach je zwei PCR-Zyklen Kontrollen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE; 4.2.2.1a) durchgeführt. Bei der Bildung des gewünschten Produktes wurde der Rest auf dem PAA-Gel elektrophoretisch von den Edukten getrennt. Die Bande mit der DNA der gewünschten Größe wurde ausgeschnitten und eluiert (4.2.2.3a). Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung (4.2.3). Die Qualität der resultierenden DNA-Lösungen wurde mit

METHODEN

einem Bioanalyzer (je 1 μ L DNA; 4.2.3) kontrolliert und die Konzentration mittels Qubit (je 1 μ L; 4.2.3) bestimmt. Pro Sequenzierung wurden insgesamt 3 ng der DNA (*input* DNA) benötigt. Die Messung erfolgte mit dem HiSeq Gerät in Braunschweig (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung). Die erhaltenen Daten (.bcl) wurden mittels des Programms von Illumina (Tab. 15, bcl2fastq conversion software 2.18) in fastq Dateien umgewandelt. Anschließend erfolgte die Sortierung der Daten mittels einer Web-Applikation und die Zuordnung der entsprechenden SELEX-Pools (Idx. 1, 3-21) gemäß den verwendeten Indizes.¹⁴⁸ Mit Hilfe der weiteren Software (Tab. 15, usegalaxy.org) wurden die resultierenden 50 bp-langen Fragmente basierend auf den überlappenden Bereichen zu den finalen Längen (76 nt) zusammengefügt.¹⁴⁹ Die Sequenzen wurden weiter mittels Notepad++ (Tab. 15; mit zusätzlichem RegEx Plugin) auf das Vorhandensein spezifischer SELEX-Primer untersucht.

4.3 Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse

4.3.1 Biotinylierung

Zur Selektion von Aptameren mittels Streptavidin-beschichteter, magnetischer Partikel wurden die Zielproteine zunächst mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (10 mM; M= 556.6 g/mol) derivatisiert. Das zu immobilisierende Protein (Tab. 11; 1.5-3 nmol) wurde mit einem dreifach molaren Überschuss an Biotinylierungsreagenz versetzt, für 15 Min. bei 4 °C und weitere 15 Min. bei RT inkubiert. Für die Abtrennung nicht umgesetzten Biotins erfolgte eine Dialyse (4.3.2). Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels Dot-Blot (4.3.3) unter Verwendung von ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase (AP) kontrolliert. Um eventuelle Proteindegradationen auszuschließen, wurde eine SDS-PAGE (15%ig) durchgeführt (4.3.4).

4.3.2 Dialyse

Die Dialyse des biotinylierten Proteins erfolgte in einem Slide-A-Lyzer® Dialysebecher (MWCO= 10.000; Thermo Scientific) für 16 h bei 4 °C gegen 1 x DPBS-Puffer oder SELEX-Puffer (Tab. 3).

4.3.3 Dot-Blot

Zunächst wurde eine definierte Menge an biotinyliertem Protein auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Als Negativkontrolle diente eine Probe die nicht modifiziert war. Nach dem Trocknen wurde die Membran in 25 mL Blockpuffer überführt und 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal in 25 mL 1 x DPBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 25 mL AK-Puffer mit 10 µL ExtrAvidin® Alkaliner Phosphatase (3.10) und es wurde weiter inkubiert. Vor der Farbreaktion wurde die Membran dreimal für je 5 Min. gewaschen. Die Zugabe von 12.5 mL AP-Substratlösung (Tab. 3) leitete die Farbreaktion ein. Die Reaktion wurde durch das Überführen der Membran in Wasser gestoppt.

4.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten unter denaturierenden Bedingungen auf deren Weg zur Anode voneinander trennen. Dabei bilden die Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) anionische Mizellen aus. Zusätze wie β -Mercaptoethanol (β -ME) oder Dithiothreitol (DTT) können die Proben denaturieren und deglykosylieren, was einen Einfluss auf die resultierende Größe auf dem PAA-Gel haben kann. Als Referenzen werden vorgefärbte und nicht-gefärbte Marker (Tab. 8) verwendet. Die vorgefärbten Proteine des Standards lassen sich auf die Membran transferieren und gewährleisten somit die Größenzuordnung nach dem *Blotting*. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli.¹⁵⁰ Für die SDS-PAGE wurden 5 - 15%ige SDS-PAA-Gele verwendet. Diese bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Zusammensetzungen sind in Tab. 5 zu sehen. Zunächst wurde der 4%ige Trenngelpuffer vorbereitet (Tab. 5). Alle Komponenten des Trenngels (Tab. 36) wurden zusammengegeben und homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung in die Gelformen gegossen und mit je 1 mL ddH₂O pro Gel überschichtet. Das sollte die gleichmäßige Polymerisation an der Geloberfläche gewährleisten.

METHODEN

Tab. 36: Zusammensetzung des Trenngels für ein 15%iges SDS-PAA-Gel.

Komponente	Volumen [mL]
Acrylamid : Bisacrylamid (30%)	15
Trenngelpuffer (4 x)	7.5
ddH ₂ O	7.2
APS (10%)	0.300
TEMED	0.030

Nach dem das Sammelgel auspolymerisiert wurde, wurde das Wasser abgegossen und die Sammelgellösung darauf gegeben (Tab. 37).

Tab. 37: Zusammensetzung des Sammelgels für ein 15%iges SDS-PAA-Gel.

Komponente	Volumen [mL]
Acrylamid : Bisacrylamid (30%)	2
Sammelgelpuffer (4 x)	3.75
ddH ₂ O	8.95
APS (10%)	0.30
TEMED	0.030

Die Proben wurden nach Bedarf mit 3 x SDS-Probenpuffer oder mit dem 6x DNA-Probenpuffer versetzt (Tab. 3) und ggf. 2 Min. bei 80 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 160 V in 1 x SDS-Laufpuffer (Tab. 3) durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Färbung der Proteinbanden mittels Coomassie *Brilliant Blue*.

4.3.5 Coomassie Färbung

Die Coomassie Färbung wurde mit dem Farbstoff Coomassie *Brilliant Blue* R 250 durchgeführt. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 2 h in Coomassie Blau-Lösung (3.3) unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Gele entfärbt. Für den besseren Kontrast wurden die Gele für 16 h in H₂O inkubiert.

4.3.6 Immobilisierung von Proteinen auf magnetischen *Beads*

Um die SELEX Experimente mit rekombinanten Proteinen durchführen zu können, wurden die Targetmoleküle an diverse magnetische *Beads* gekoppelt. Dies ermöglichte die Trennung von gebundenen und ungebundenen Oligonukleotiden während des Selektionsprozesses.

METHODEN

4.3.6.1 Bindung der Proteine an SiMAG-Beads

Für die Immobilisierung der Proteine wurden 50 μL (2.5 mg) der *Beads* zunächst zweimal mit je 1 mL 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES) gewaschen. Daraufhin wurden 23 μg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in 80 μL MES-Puffer gelöst und die *Beads* darin aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation bei 500 rpm bei RT (Aktivierung der Carboxylgruppe Abb. 19) wurden 12.5 μg des entsprechenden Proteins (Tab. 11; CD24-IgG oder IgG) hinzugefügt.

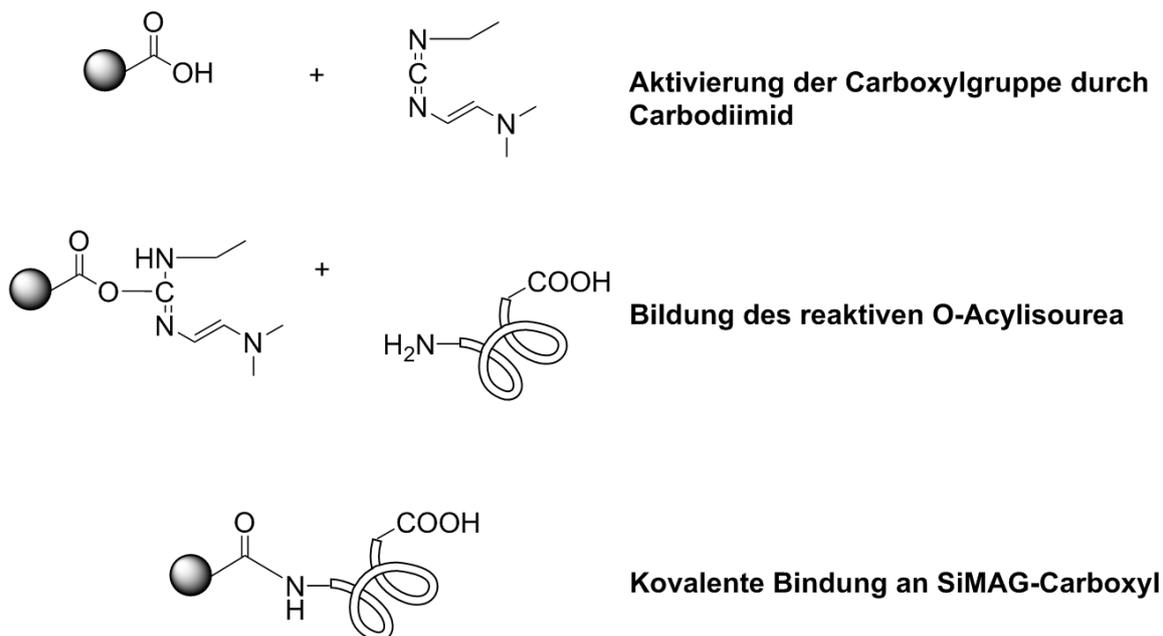


Abb. 19: Prinzip der Immobilisierung von Proteinen auf magnetischen SiMAG-Carboxyl-Beads.

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 5 $^{\circ}\text{C}$ und 650 rpm und anschließend für weitere 2 h bei RT und 650 rpm. Danach wurden die *Beads* dreimal mit je 250 μL 1 x DPBS gewaschen und in 750 μL Blockierungs- und Lagerungspuffer (1 x DPBS, 0.1% BSA, 0.05% Natriumazid) aufgenommen.

4.3.6.2 Kopplung der Proteine an Dynabeads™ Protein G-Beads

Hierzu wurden 150 μL (4.5 mg) *Beads* nach dem Resuspendieren dreimal in je 600 μL DPBS/Tween/BSA-Puffer (Tab. 3) gewaschen und in 600 μL der gleichen Lösung aufgenommen. Dann wurde das gewünschte Protein (CD24 oder IgG; Tab. 11) zugegeben und 30 Min. bei 800 rpm und RT inkubiert. Nach dem dreifachen Waschen, analog wie oben beschrieben, wurden die Protein-Beads in 1200 μL

METHODEN

DPBS/BSA/Tween-Puffer aufgenommen, um eine Endkonzentration von 25 ng/ μ L zu erreichen. Die Kopplungseffizienz wurde entweder mit Durchflusszytometrie oder nach der Elution mit Glycinlösung auf einem SDS-Gel (4.3.4) analysiert. Für die Elution wurden 15 μ L Protein-*Beads*-Lösung entnommen (max. 375 ng Protein) und mit 4.5 μ L an 0.1 M Glycin-Lösung (pH = 2.5) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 Min. bei 900 rpm und RT. Nach dem Neutralisieren mit 1 μ L an 1 M Tris-Puffer (Tab. 3) wurde die Probe mit 3 x SDS-Puffer versetzt. Nach dem thermischen Denaturieren erfolgte die Elektrophorese.

4.3.6.3 Bindung der Proteine an His-Tag Isolation Dynabeads™

Das Embp170-Protein, welches über einen His-Tag verfügte, wurde auf den His-Tag Isolation Dynabeads™ (Tab. 12) immobilisiert. Die Bindung erfolgte hier aufgrund der Affinität des Histidin-Tags zu den Cobalt-Ionen, die an der *Bead*-Oberfläche angebracht sind. Als Puffer wurde DPBS verwendet. Hierzu wurden je 100 μ L *Beads* mit 100 μ L Embp170-Proteinlösung (1.44 ng/mL; 144 μ g) versetzt. Die Inkubation wurde erst für 10 Min. bei RT und 800 rpm durchgeführt und anschließend weitere 30 Min. bei 4 °C auf einem Rollschüttler gestellt. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 μ L SELEX-Puffer (HEPES) wurden die *Beads* auf eine Konzentration von 0.05 μ g/ μ L eingestellt. Die Elution des Proteins erfolgte mit der 300 nM Imidazol-Lösung (5 Min. bei RT). Die Effizienz der Kopplung wurde sowohl mit SDS-PAA-Gelelektrophorese als auch mit der Durchflusszytometrie überprüft.

4.3.6.4 Kopplung der Proteine an Dynabeads™ 280

Die zuvor biotinylierten Proteine wurden mit 30 nmol Biotin-Streptavidin-Dynabeads für 30 Min. bei RT inkubiert, wobei die Lösung alle 10 Min. auf- und abpipettiert wurde, um eine Sedimentation der *Beads* zu verhindern. Durch die Interaktion des Biotins mit Streptavidin kommt es zur Immobilisierung des biotinylierten Proteins auf der Oberfläche dieser magnetischen Partikel. Zur Kopplungsreaktion wurden 500 μ L Dynabeads® fünfmal mit je 500 μ L 1 x DPBS gewaschen. Nach dem Resuspendieren in 1000 μ L 1 x DPBS wurden 100 μ g biotinyliertes Protein zugegeben und 15 Min. bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit je 500 μ L 1 x DPBS wurden die mit Protein-beladenen *Beads* in 1500 μ L 1 x DPBS aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

METHODEN

a) Kontrolle der Kopplung mit Hilfe von SDS-PAGE

Hierzu wurden 15% SDS-Gele vorbereitet (Tab. 5). Es wurden je 2 μL (2.9 μg) Protein, 2 μL *Bead*-Eluat (2.9 μg) vor und nach der Dialyse sowie je 10 μL (max. 2.9 μg) von jedem der drei Waschschr tte mit je 3 x Probenpuffer (Tab. 3) versetzt und 2 Min. bei 95 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Nach dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteine im elektrischen Feld getrennt (4.3.4) und mittels Coomassie-Färbung detektiert (4.3.5).

b) Nachweis des Embp170-Proteins auf den magnetischen *Beads*

Hierzu wurden je 20 μL *Beads* mit je 500 μL 1 x DPBS (Tab. 3) gewaschen. Danach wurden sie in 100 μL aufgenommen, mit 1 μL Antikörper (Tab. 14) versetzt und 20 Min. bei RT inkubiert. Dann erfolgte 3 x Waschen mit je 100 μL DPBS und die Inkubation mit 1 μL des sekundären Antikörpers. Nach weiteren drei Waschschr tten wurden die *Beads* abschließend in 200 μL DPBS aufgenommen und vermessen. Zur Kontrolle wurden die leeren *Beads* und die Kreuzreaktion mit dem Sekundärantikörper verwendet. Der Einstellungen sind in 4.1.6.1 dargestellt.

4.4 *In vitro* Selektion von DNA-Aptameren

Für die Selektion der Aptamere wurde, wenn nicht anders erwähnt, ein DNA-Pool genutzt bei dem der 40 nt lange randomisierte Bereich von zwei 18 nt langen Consensus-Regionen flankiert war (Tab. 9). Mit Hilfe der SELEX-Methode sollen von Runde zu Runde dem Target immer affinere Nukleinsäure-Pools erhalten werden. Die bindenden Nukleinsäuren wurden durch Waschschr tte, Änderungen der Salzkonzentrationen oder durch die Verwendung spezieller Substituenten gezielt von den weniger affinen Nukleinsäuren getrennt. Zusätzlich wurden auch Kompetitoren (BSA, Nukleinsäure-Pools, Heringssperma, Dextransulfat oder FKS) eingesetzt. Die Selektions-Progression wurde anhand der PCR-Zyklen und des Diversitätsassays überwacht. Am Ende wurden Bindungsstudien mittels Durchflusszytometrie und radioaktiven Assays durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführten SELEX-Methoden sind in Tab. 38 dargestellt.

Tab. 38: Übersicht über unterschiedliche Abwandlungen der SELEX-Methoden.

SELEX	Besonderheiten	Vorteile	Nachteile
-------	----------------	----------	-----------

METHODEN

Protein SELEX (N-SELEX)	Target: rekombinantes Protein	Gereinigtes Protein als Target; gut etabliert	Nicht bekannt, ob das Target seine native Struktur aufweist
Click-SELEX	Modifizierung der DNA durch Einfügen diverser Substituenten	Erhöhte Affinität gegenüber dem Target; Erweiterung des natürlichen Basenspektrums	Falsche/ zu viele Substituenten
Mg²⁺ Gradient-SELEX	Konzentration der Mg ²⁺ -Ionen wird von Runde zu Runde verringert	Vermutlich geringere Beeinflussung der Affinität durch Unterschiede in der Mg ²⁺ -Konzentration	Probleme der DNA-Faltung
Zell-SELEX	Target: lebende Zellen	Target in seiner nativen Form	Viele potenzielle Targets
Fusion-SELEX	Es wird zwischen Protein- und Zell-SELEX geschaltet	Gezieltes Ansteuern der gewünschten Oberflächenmoleküle	Unterschiede in den Target-Tertiärstrukturen
Komplementäre-SELEX (C-SELEX)	Primer-Bereiche der Nukleinsäuren werden blockiert	Interferenz der Primer-Regionen ausgeschlossen; Ausbildung stabilerer 3D-Strukturen der Nukleinsäuren	Noch nicht gut etabliert
Kompetitions-SELEX	Target: Komplex aus Target und seinem Interaktionspartner	Durch Verdrängen des Interaktionspartners, soll das Aptamer an die gleiche Bindungstasche binden	Aptamer muss in der Lage sein, den Interaktionspartner zu verdrängen; oft werden andere Bindungsstellen bevorzugt

Um die Affinität der Aptamere zu bestimmen, wurden die Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) mittels des *One-site-binding*-Modells ermittelt.

$$Y = \frac{X \cdot B_{\max.}}{X + K_d} \quad \text{Gl. 5}$$

In der Gleichung 5 sind:

$B_{\max.}$: Anteil an maximal gebundener DNA

X: Konzentration an DNA

4.4.1 Zell-SELEX

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zell-SELEX-Experimente wurden sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C durchgeführt. Die Elution der an den Zellen gebundenen DNAs wurde mittels Hitze-Denaturierung für 2 Min. bei 96 °C vorgenommen. Nach dreifachem Zentrifugieren (16.000 x g, 30 s) zum Abtrennen der Zellbestandteile, wurde der gesamte DNA-Pool in einer PCR (Tab. 18 und Tab. 20) für zehn Zyklen amplifiziert. Danach wurden 10 µL des bereits vervielfältigten DNA-Ansatzes einer präparativen PCR unterzogen, um die Menge des Nukleinsäurepools im Vergleich zu den noch übriggebliebenen Zellbestandteilen deutlicher hervorzuheben. Nachdem die PCR-Zyklusanzahl optimiert wurde, konnten die DNA-Pools nach Strangtrennung (Tab. 31) in weiteren Runden eingesetzt werden. Um die Spezifität der Nukleinsäuren zu steigern, wurden für die negativen Selektionen ausschließlich die Zelllinien genutzt, bei denen die Produktion des Targetproteins mittels shRNA-Technik unterdrückt wurde (*Knockdown*). Die negative Selektion erfolgte unmittelbar vor der positiven Selektion. Dabei wurde der Überstand nach der Inkubation mit den *Knockdown*-Zellen auf die Target-tragenden Zellen gegeben und weiter inkubiert.

a) Zell-SELEX bei 37 °C

Die DNA-Pools wurden zunächst 5 Min. auf 95 °C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Als Selektionsmedium diente der DPBS-Puffer (Tab. 4; Tab. 59) oder das DMEM-Medium (Tab. 4; Tab. 63). Bei der SELEX für das CD54-Molekül (Tab. 4; Tab. 63) wurden in den ersten Runden dem Serum noch 10% (V/V) an FKS zugesetzt. Durch die in dem FKS-Serum enthaltenen DNasen sollten die weniger stabilen DNA-Moleküle abgebaut werden, um möglichst stabile Aptamere zu selektieren. Nach dem Waschen wurden die Zellen abgekratzt und durch Hitze einwirkung von der DNA eluiert.

b) Zell-SELEX bei 4 °C

METHODEN

Die Zell-SELEX mit den HT-29-Zellen wurde von Herrn Tobias Sitz im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen während der Inkubation (0.5-1 h) auf Eis gestellt. Zunächst wurden die Zellen fünfmal mit einer Lösung aus 150 mM HEPES (pH 7.4) versetzt und mit je 1 mM CaCl_2 und MgCl_2 wie in Tab. 41 beschrieben gewaschen. Nach der Inkubation mit dem, wie in Tab. 33 dargestellt, renaturierten DNA-Pool wurden von Runde zu Runde die Waschschriffe und das Waschvolumen erhöht. Als Targetzellen dienten die HT-29-Zellen und für die negative Selektion die HT-29 CD24-*Knockdown*-Zellen. Der Selektionsdruck wurde unter anderem durch das Erhöhen der Konzentration an NaCl sowie der Menge an kompetitiver DNA und BSA ausgeübt.

4.4.2 *Click*-SELEX

Bei der *Click*-SELEX wurde ein spezieller DNA-Pool verwendet (FT2-Pool; Tab. 9). Dieser unterschied sich von dem sonst benutzten DNA-Pool nicht nur in der Länge der DNA-Moleküle, sondern trug Ethynyluridine anstelle von Thymidinen. Es wurden je 3 mL PCR-Produkt (Tab. 22 und Tab. 23) für jede SELEX-Runde eingesetzt. Die PCR-Produktbildung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (4.2.2.1b; 5 μL Produkt; 4%ige Agarose; 10 Min.; 150 V) kontrolliert. Nach der Reinigung des Produktes (Tab. 8; NucleoSpin Macherey und Nagel) wurde mit Hilfe der Lambda- Exonuklease die doppelsträngige DNA für eine Stunde im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 650 rpm (Tab. 31) zu Einzelsträngen hydrolysiert. Danach konnten die Substituenten mittels *Click*-Chemie eingeführt werden. Dazu wurden zunächst 100 μL an katalytischem Reagenz (Tab. 39) vorbereitet. Hierzu wurde die 100 mM Ascorbatlösung stets frisch zubereitet. Jedesmal wurde nicht nur der FT2-Pool sondern auch der Kompetitor-DNA-Pool (Tab. 40) mittels *Click*-Chemie derivatisiert. Hierzu standen 24 Azidverbindungen als Substituenten (Abb. 20) zur Auswahl. Die 1,3-Dipolare-Cycloaddition wurde für eine Stunde im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 650 rpm vervollständigt.

METHODEN

Tab. 39: Die Zusammensetzung der Reagenzlösung zur Durchführung der Katalyse.

Reagenz	Konz. [mM]	Volumen [μ L]	Finale Konz. [mM]
ddH ₂ O		70	
THPTA	100	4	4
CuSO ₄	100	1	1
Ascorbat	100	25	25

Für die SELEX wurde das Zielprotein (CD24) zunächst auf magnetischen *Beads* (4.3.6.2) immobilisiert. Die negative Selektion (mit den magnetischen *Beads* ohne Target) wurde wie die positive SELEX für 30 Min. bei 37 °C und 650 rpm im Inkubationsschüttler durchgeführt (Tab. 61 und Tab. 62).

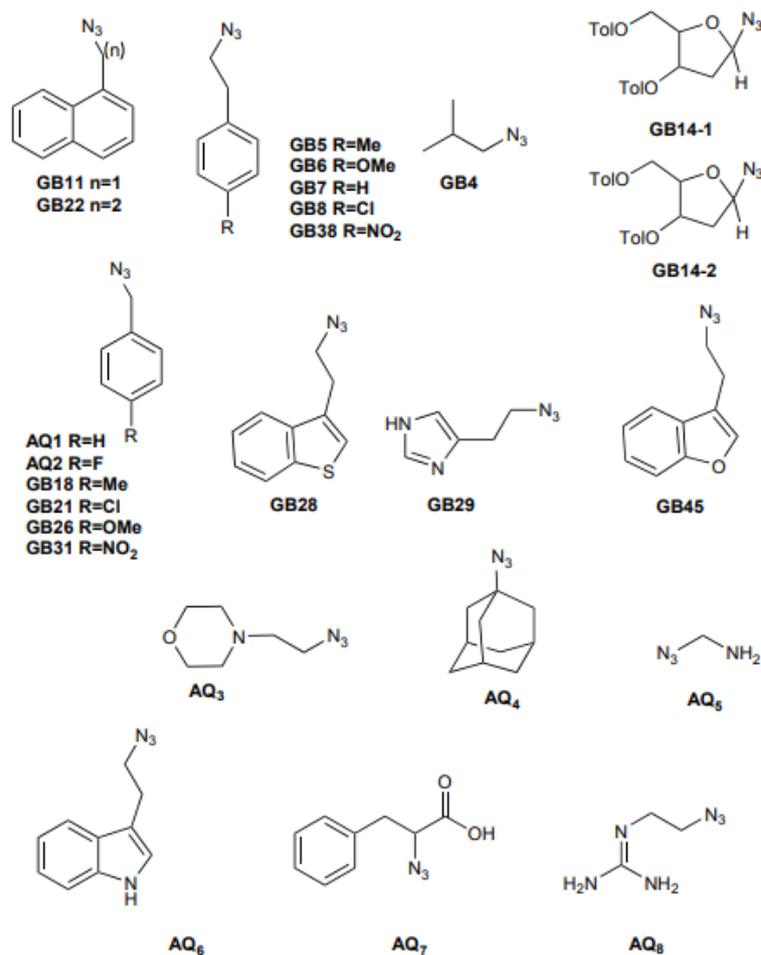


Abb. 20: Die vorhandenen Azid-Verbindungen. Es wurden folgende Azidverbindungen ausgesucht: Indolazid (AQ₆), Phenylalaninazid (AQ₇) und Guanidiniumazid (AQ₈).

METHODEN

Tab. 40: Zusammensetzung eines Click-Ansatzes. Das Reaktionsvolumen betrug 100 μL .

Reagenz	Konz.	Vol. [μL]	Finale Konz.
Phosphat-Puffer (pH 7)	10 x	10	
Pool (Alkin)/ Kompetitor		70	
Azid	10 mM	10	1 mM (100 nmol)
Reaktionslösung (Tab. 39)		10	

Die Elution der Nukleinsäuren von den Target-*Beads* erfolgte für 3 Min. bei 80 °C.

4.4.3 Konventionelle SELEX

Für die Selektion von Aptameren für Embp170 und Embp125 wurde die konventionelle SELEX-Methode angewandt. Embp170 wurde über einen His-Tag an die Cobalt-*Beads* (4.3.6.3) immobilisiert, die biotinylierten Proteine (Embp125 und FNIII) an Streptavidin-*Beads* (4.3.6.4) gebunden. Dann wurde der DNA-Pool in entsprechendem SELEX-Puffer (Tab. 6) de- und wieder langsam renaturiert (Tab. 33). Bei der SELEX für das CD24-Molekül, in der die ersten Runden mit einer konventionellen SELEX erfolgten (Tab. 60, pro Runde 50 μL *Beads*; 12 μg), wurde CD24 über die primären Aminogruppen an die SiMAG-Carboxyl-*Beads* (4.3.6.1) fixiert. Um die Stringenz des Selektionsprozesses zu steigern, wurden bei der SELEX mit dem Target Embp170 (N-SELEX) folgende Parameter von Runde zu Runde variiert: die Menge an *Beads*, an kompetitivem SELEX-Pool und der Einsatz an Heringssperma-DNA. Gleichzeitig wurde auch die Anzahl an Waschsritten stetig erhöht (Tab. 64). Bei der C-SELEX wurden zusätzlich vor der Inkubation mit dem Target die Primerregionen der Nukleinsäuren mit komplementären Oligonukleotiden hybridisiert. Bei Embp125, dem zweiten Embp-Fragment, wurde während der SELEX die Menge an Magnesiumionen reduziert. Der Selektionsdruck wurde durch das Erhöhen der Waschsritte und des Waschvolumens sowie der dynamischen Inkubationsbedingungen ausgeübt (Tab. 65). Außerdem wurde ab Runde 10 zusätzlich ein kompetitiver Selektionsschritt eingeführt. Dabei wurde der DNA-Pool mit dem Embp125-FNIII-*Bead*-Komplex inkubiert. Nach der Inkubation mit den Nukleinsäuren wurde der Komplex durch das Erhitzen auf 96 °C für 2 Min. getrennt.

4.5 Charakterisierung der Aptamere

4.5.1 Stabilitätsassay der Aptamere

Zur Untersuchung der Stabilität der DNA wurden jeweils 6.4 μL des CD24A_2 Cy5-markierten Aptamers (1 μM) mit jeweils 113.6 μL des RPMI-Mediums bzw. des RPMI-Mediums mit 10% FKS versetzt. Die Inkubation der 40 nM-Lösungen erfolgte für 24 h bei 37 °C. Dabei wurden nach 0, 1, 2, 5, 10, 15 und 30 Min. sowie 1, 2, 4, 8 und 24 h jeweils 10 μL abgenommen und sofort mit 10 μL transparentem 2 x denat. Probenpuffer (Tab. 3) gemischt und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Die Proben (je 8 μL) wurden dann auf ein 10%iges denat. Gel (Tab. 5) aufgetragen. Die PAGE (4.2.2.1) erfolgte bei 250 V für 40 Min., anschließend wurden die Gele in einer Geldokumentationsanlage (Tab. 16) unter Verwendung einer entsprechenden Kamera dokumentiert.

4.5.2 Sekundärstrukturvorhersage selektierter Oligonukleotide

Die Vorhersage der Sekundärstrukturen der erhaltenen Nukleinsäuremoleküle erfolgte algorithmisch mit dem Programm Mfold (DNA *folding form*) von The RNA Institute (University at Albany state University of New York). Dabei wurden die entsprechenden Ionenkonzentrationen mitberücksichtigt.

4.5.3 Tertiärstrukturvorhersage selektierter DNA Aptamere

Die Tertiärstrukturvorhersagen der erhaltenen Aptamere wurden mit Hilfe des Web-basierten Programms SimRNAweb vom International Institute of Molecular and Cell Biology (Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering, Warsaw) durchgeführt.

4.5.4 CD-spektroskopische Analyse der Struktur von CD24A_2

Die Faltung des Aptamers CD24A_2 wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurde eine DNA-Lösung (100 mM) in HEPES-Puffer (20 mM; pH 7.4) mit MgCl_2 (1 mM) und CaCl_2 (1 mM) vorbereitet. Als Kontrolle wurde das CD24A_2 (100 mM) in ddH₂O verwendet. Außerdem wurden noch Aptamerlösungen vorbereitet, welche zusätzlich entweder mit LiCl, KCl, NaCl oder mit NaCl und KCl (jeweils 150 mM; SELEX-Bedingungen) versetzt wurden. Nach Denaturierung und langsamer Faltung (Tab. 33) wurden die DNA-Lösungen entweder auf Eis oder bei Raumtemperatur

METHODEN

aufbewahrt. Die Proben wurden in einem CD-Spektrometer (Tab. 16) bei 4 °C und bei 37 °C gemessen. Für jede Bedingung wurde je ein Spektrum erstellt, welches aus 30 aufgenommenen Einzelmessungen resultierte.

4.5.5 Studien zur Internalisierung von CD24A_2 durch HT-29-Zellen

Hierzu wurde das Cy5-modifizierte Aptamer (647 nM) zunächst im CD24-Zell-SELEX-Puffer (Tab. 6) gefaltet (Tab. 33). Danach wurden die Zellen für 7 Min. mit Accutase (analog wie mit Trypsin 4.1.2) behandelt. Nach dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurden die geernteten Zellen auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro 100 μL eingestellt. Nach dem Pelletieren der Zellsuspension (500 x g bei 4 °C) erfolgte die Inkubation in der zuvor gefalteten (Tab. 33) Aptamer-Lösung (50 μL 136 nM) für 30 Min. bei 4 °C oder bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden die Zell-Aptamer-Komplexe fünfmal mit je 100 μL SELEX-Puffer bei 500 x g und 4 °C gewaschen. Danach wurde die Zell-Aptamer-Suspension mit 0.5 U DNase I für 30 Min. bei 37 °C behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen noch dreimal mit SELEX-Puffer gewaschen und mittels BD FACSCalibur™ (Tab. 16) im FL4-Kanal vermessen.

4.5.6 Aptamer-Antikörper-Kompetitionsstudie

Für den Kompetitionsassay wurden die Zellen wie für die Zell-Internalisierungsstudie (4.5.5) vorbereitet. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem zuvor gefalteten (Tab. 33) Cy5-Aptamer (136 nM; 647 nm). Nach 30 Min. bei 4 °C wurden die Zellen dreimal in 500 μL SELEX-Puffer bei 500 x g und 4 °C gewaschen und mit dem primären Antikörper (Tab. 14) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden die Zellen mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (Tab. 14; 1 μL ; 488 nm) behandelt. Das gleiche Vorgehen erfolgte bei Proben, denen keine weiteren Komponenten zugesetzt wurden. Anstatt der Zugabe von Aptameren oder von Antikörpern wurden sie lediglich in SELEX-Puffer inkubiert. Nachdem die Zellen noch dreimal gewaschen wurden, erfolgte die Messung an einem BD FACSCalibur™ (Tab. 16) im FL-1 (FITC) und FL4-Kanal (Cy5).

4.5.7 Bindungsstudien

4.5.7.1 Radioaktiv

Mit lebenden Zellen

Die Zellen (HCT116 or HT-29) wurden mit Hilfe von Accutasebehandlung (2 oder 7 Min.; analog wie 4.1.2) gelöst und gewaschen. Das Zell-Pellet wurde in dem entsprechenden SELEX-Puffer (Tab. 6) aufgenommen. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit der ^{32}P -markierten ssDNA (Tab. 32; ca. 21 ng; 30000-80000 ips) unter SELEX-Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen viermal gewaschen (2 Min. bei 500 x g) und das Pellet in 100 μL SELEX-Puffer aufgenommen. Für die Bestimmung der Bindungsaffinität der Nukleinsäuren gegenüber den Zellen wurden der Überstand, die Zellen und auch die vier Waschfraktionen mittels Szintillationszähler (TRI-CARB 2500TR, Tab. 16) gemessen. Als negative Kontrollen dienten die jeweiligen Ausgangsbibliotheken sowie die Resultate der Bindung zwischen den Nukleinsäuren und den *Knockdown*-Zellen.

Mit magnetischen Beads

a. Embp170

25 μL von Embp170 markierten His-Tag *Beads* (4.3.6.3) wurden in 50 μL SELEX-Puffer (Tab. 6) für 30 Min. bei 37 °C und 800 rpm im Inkubationsschüttler mit ^{32}P -DNA (Tab. 32; 30000-80000 ips) inkubiert. Nach vierfachem Waschen wurden die *Beads* in 50 μL SELEX-Puffer aufgenommen. Alle gesammelten Fraktionen wurden mit dem (TRI-CARB 2500TR, Tab. 16) vermessen, um die Affinität der ^{32}P -DNA gegenüber den Target-*Beads* und den leeren *Beads* zu bestimmen. Als negative Kontrollen dienten zum einen die leeren *Beads* und zum anderen die Affinität der Start-DNA-Bibliothek gegenüber den mit Target beladenen *Beads*.

b. Embp125

Um den Embp125-FNIII-Komplex zu erhalten, wurden erst 80 μL der FNIII-Streptavidin-*Beads* (4.3.6.4) mit dreifachem molaren Überschuss an Embp125-Protein versetzt und bei RT und 300 rpm in den Inkubationsschüttler gestellt. Nach dem Waschen des entstandenen Komplexes erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit den

METHODEN

radioaktiv markierten ^{32}P -DNA-Pools (Ausgangsbibliothek, Pool 5, 9 und 11). Die jeweiligen DNA-Pools (Tab. 32; 30000-80000 ips) wurden mit je 20 μL an dem Komplex, den Embp125-Streptavidin-*Beads* oder den Streptavidin-*Beads* unter den Bedingungen der SELEX (Tab. 65) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die *Beads* und die Waschfraktionen mit Szintillationszähler (TRI-CARB 2500TR, Tab. 16) vermessen. Abschließend wurde die prozentuale Menge an gebundener DNA berechnet.

4.5.7.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie (4.1.6) wurden die Affinitäten der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide zu ihren Targets ermittelt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Oligonukleotide am 5`-Ende entweder mit FITC- oder mit Cy5-Molekülen in einer PCR fluoreszenzmarkiert (Tab. 19) oder bei Sigma-Aldrich käuflich erworben. Für die Bindungsstudien der DNA-Pools aus den SELEX-Runden wurden die Zellen wie für die radioaktiven Studien (4.5.7.1) vorbereitet und mit den DNA-Lösungen (500 nM) unter SELEX-Bedingungen inkubiert. Bei den Messungen der Dissoziationskonstanten (K_d) wurden die HT-29-Zellen (5×10^5) mit einer DNA-Konzentrationsreihe von 0.5 bis 500 nM oder von 32 bis 4000 nM (bei den schwachen Bindern) versetzt. Es wurde weiter wie in 4.5.7.1 vorgegangen. Die Messbedingungen sind in Tab. 17 dargestellt. Die resultierenden Histogramme wurden als logarithmische Funktionen der mittleren Fluoreszenz der Zellpopulationen im Vergleich zur Zellzahl dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in 4.1.6 beschrieben.

5 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit lag in der Selektion von Aptameren, die medizinisch relevant sind. Es wurde nach solchen Targets gesucht, für die bisher keine affinen, einzelsträngigen Oligonukleotide generiert wurden. Die ausgesuchten Zielmoleküle CD24 und CD54 (ICAM-1) spielen bei Metastasierungsprozessen eine wichtige Rolle.^{79,83,91,94,106,151} Das bakterielle Embp-Protein dagegen ist entscheidend für das pathogene Verhalten von *S. epidermidis*.¹⁵² Alle drei Moleküle sind Zelloberflächenproteine. Dabei weist die äußere Schicht der Zellmembran oder der Zellwand, die Glycocalyx, eine negative Ladung auf. Deswegen kann sich das Adressieren der sich dort befindenden Moleküle mit Nukleinsäuren prinzipiell als kompliziert erweisen.^{153,154} Hinzu kommt, dass die ausgesuchten Targetmoleküle untereinander sehr heterogene Strukturen aufweisen. Dabei kann es sich *per se* um einen strukturellen Unterschied handeln, wie z. B. die intramolekulare Dimerisierung der ICAM-1 Domänen.^{155,156} Die strukturelle Differenz kann zusätzlich zu einer Veränderung der Gesamtladung des Moleküls führen, z. B. zu unterschiedlichen Glykosylierungsmustern der CD24-Moleküle. Um Aptamere für diese Targets zu finden, wurden unterschiedliche SELEX-Methoden (4.4) verwendet. Die experimentellen Bedingungen wurden immer der aktuellen Fragestellung angepasst. Die Zielmoleküle sind sowohl in rekombinanter als auch in nativer Form eingesetzt worden. Dabei wurden unterschiedliche Targets, diverse Träger der Zielmoleküle (Matrizies) und artifizielle Nukleinsäuren verwendet.

5.1 Allgemeine Vorgehensweise

Für die Selektion von Aptameren wurde zunächst eine kombinatorische DNA-Bibliothek mittels Gelelektrophorese gereinigt (denat. PAGE; 4.2.2). Dadurch sollten mögliche Strangabbruchprodukte aus der Oligonukleotidsynthese entfernt werden. In Abb. 21 ist zu sehen, dass sich bei der Amplifikation des Bibliothekpools die Bildung von Nebenprodukten (diffuse Bande zwischen 100 und 150 bp) mit zunehmender PCR-Zyklen-Zahl negativ auf die Menge des gewünschten Produktes auswirkte.

ERGEBNISSE

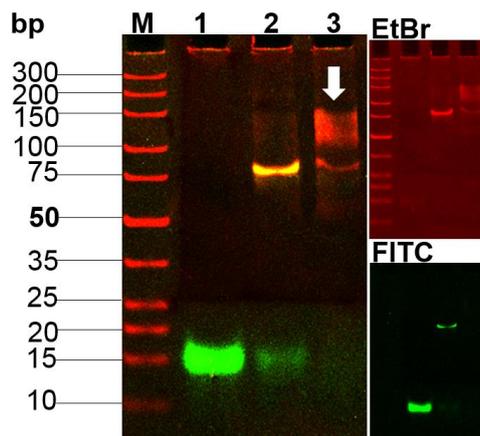


Abb. 21: 10%iges natives Gel zur Kontrolle von PCR-Produkten der Ausgangs-DNA-Bibliothek. Die Spuren sind wie folgt belegt: M: 0.25 μ g *O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 1: 4 μ L Negativkontrolle (NK) nach 6 PCR-Zyklen; Spur 2: 4 μ L Produkt nach 4 PCR-Zyklen; Spur 3: 4 μ L PCR-Produkt nach 6 PCR-Zyklen. Die Abbildung zeigt die Visualisierung der FITC-markierten DNA-Pools im Ethidiumbromid-Kanal (UV; EtBr) und im Fluorescein-5-isothiocyanat Kanal (488 nm; FITC). Zusätzlich wurde ein *Overlay* dieser zwei Bilder (links) erstellt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bei einem SELEX-Prozess die Zahl der PCR-Zyklen präzise bestimmt werden muss. Auch in geringeren Mengen entstandene überamplifizierte Nebenprodukte können in den nachfolgenden SELEX-Runden wiedergefunden werden.¹⁵⁷ Um relevante Aptamere selektieren zu können, wurde vor jeder SELEX-Runde ein einzelsträngiger DNA-Pool enzymatisch generiert. Für einen effizienten Abbau des komplementären Stranges wurde die Konzentration der abzubauenen dsDNA über den Vergleich mit einem DNA-Marker abgeschätzt. Der Erfolg der Nukleasereaktion wurde mit Hilfe von PAGE (Abb. 22) untersucht. Wenn eine Zell-SELEX durchgeführt wurde, wurde die von dem Target eluierte DNA zunächst einer Zehn-Zyklus-Amplifikations-PCR unterzogen. Damit sollte vermieden werden, dass potenzielle Aptamere verloren gehen. Je 1 μ L des resultierenden Produktes wurde als Templat für die nachfolgende, präparative PCR genutzt. Dadurch sollte die Amplifikations-Lösung verdünnt werden, da diese trotz Zentrifugation noch Zellkompartimente und DNA aufwies. Um die Ähnlichkeit der Moleküle in den Pools untereinander vergleichen zu können, wurde der Verwandtschaftsgrad berechnet (Gleichung 6). Dieser setzt sich aus der Anzahl an Basen in der Consensus-Sequenz des Pools zu der Länge des randomisierten Bereiches zusammen.

$$\text{Verwandtschaftsgrad [\%]} = \frac{\text{Basen in Consensus-Sequenz [nt]}}{\text{Basen im randomisierten Bereich [nt]}} \times 100$$

Gl. 6

ERGEBNISSE

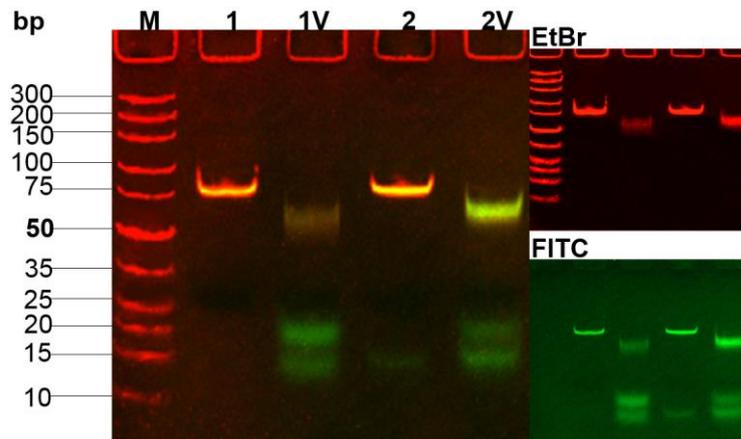


Abb. 22: 10%iges natives PAA-Gel zur Kontrolle der enzymatischen Spaltung der dsDNA. Mit Hilfe der λ -Exonuklease können am 5'-Ende phosphorylierte Einzelstränge in dsDNA-Strängen spezifisch abgebaut werden. In der Spur M: 0.25 μ g *O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 1 und Spur 2: 140 ng dsDNA mit der Länge von 76 bp. Spur 1V und Spur 2V: aus Spur 1 und 2 resultierende Abbau-Produkte (ssDNA). Visualisierung wie in Abb. 21 beschrieben.

5.2 Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für das CD24-Molekül

Zell-SELEX mit HCT116-Zellen

Um Aptamere für das CD24-Molekül zu selektieren, wurde zunächst eine Zell-SELEX durchgeführt. Dabei wurden HCT116-Zellen als Target und HCT116 *Knockdown* CD24-Zellen (HCT116 kd CD24) für die negative SELEX verwendet. Die HCT116-Zellen wurden stetig auf die Anwesenheit des CD24-Moleküls sowie auf die stabile Unterdrückung der Translation dieses Proteins getestet (Abb. 63). Die sogenannten *Knockdown*-Zellen wurden mittels shRNA-Technik in der Arbeitsgruppe von Prof. U. Schumacher (UKE Hamburg) generiert. Nach fünf SELEX-Runden (davon drei Runden mit CD24 *Knockdown*-Zellen) konnte trotz der Erhöhung der präparativen PCR-Zyklen-Anzahl auf 33 keine Produktbildung beobachtet werden (Tab. 59).

Konventionelle SELEX und Zell-SELEX mit HT-29-Zellen

Im Folgenden wurde eine Selektion durchgeführt, bei der zwei unterschiedliche SELEX-Methoden angewandt wurden. Im ersten Teil sollten in einer konventionellen Selektionsmethode Binder für das Targetmolekül selektiert werden. In der nachfolgenden Zell-SELEX sollten dann diejenigen Nukleinsäuren aussortiert werden, die das Targetmolekül in seiner nativen Faltung erkennen konnten. Hierzu wurden erst neun Runden mit dem rekombinanten CD24-Molekül (CD24-IgG₁-Chimera-Protein;

ERGEBNISSE

Abb. 64) als Target durchgeführt. Der Dot-Blot mit dem rekombinanten Protein (Abb. 65) zeigte, dass dieses durch den Antikörper (ML-5, Tab. 11) erkannt wurde. Um die Selektion zu ermöglichen, wurde das CD24-Molekül auf magnetischen Partikeln (4.3.6.1) immobilisiert. Das Bindungsprinzip der SiMAG-Carboxyl-*Beads* (Abb. 19) beruht auf der Bindung zwischen dem reaktiven Carbodiimid der *Bead*-Oberfläche mit der Aminogruppe des Proteins. Deswegen kann es neben dem N-Terminus auch kovalent mit Aminosäuren verbunden werden, die primäre Amine in ihren Seitenketten besitzen (R: Arginin, N: Asparagin und K: Lysin). Das humane rekombinante CD24-Molekül weist mehrere solcher Positionen in seiner Aminosäuresequenz auf (Abb. 64).

Es wurden neun Runden mit dem immobilisierten rekombinanten CD24-IgG Protein als Target durchgeführt. Die negative SELEX wurde in den Runden 2 sowie 7-9 durchgeführt. Ziel hierbei war der Ausschluss von IgG-Bindern aus dem Selektionspool. Nachdem die Zell-SELEX mit HT-29-Zellen durchgeführt worden war, kam es zu einem steten Verlust in der DNA-Pool-Konzentration (Tab. 60; PCR: 10+6 bis 12+8-Zyklen). Nach 15-SELEX-Runden wurde der Selektionsprozess beendet und die Bindung gegenüber HT-29-Zellen getestet. Die Bindungsstudien der mit FITC-markierten Ausgangsbibliothek (20 pmol) und den DNA-Molekülen aus den Runden 5, 10 und 15 wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (4.5.7.2). Hierzu wurden die zu untersuchenden DNA-Pools in einer PCR am 5'-Ende mit FITC-Molekülen (Tab. 19) versehen. Die Pools zeigten einen deutlichen Anstieg in ihrer Affinität (vierfach höher) gegenüber CD24-präsentierenden Zellen im Vergleich zu CD24 *Knockdown*-Zellen (Abb. 66), aber es konnte kein Selektionserfolg beobachtet werden.

Click-SELEX

Für die Selektion eines Aptamers für das CD24-Molekül wurde auch die *Click-SELEX* verwendet. Dabei wurde das rekombinante Target an magnetischen *Beads* immobilisiert (4.3.6.2). Der Erfolg der *Bead*-Protein-Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (Abb. 67). In den Vortests wurde der alkinierte DNA-Pool (FT-2-Pool; Tab. 9) der Bindung mit leeren *Beads* sowie CD24-*Beads* ausgesetzt (Abb. 68).⁴⁷ Im Vergleich zu den leeren *Beads* zeigte der Alkin-Pool eine zweimal höhere Affinität gegenüber den magnetischen *Beads*, *welche* zuvor mit dem CD24-

ERGEBNISSE

IgG-Chimer-Protein beladen worden waren. In einem zweiten Schritt sollte der alkinierter Pool mittels Azid-Alkin-Cycloaddition modifiziert werden. Aus den 27 Aziden (Abb. 20) wurden zwei für die SELEX-Bedingungen passende ausgesucht. Da Zuckermoleküle bei einem neutralen pH von 7.4 hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Molekülen interagieren, wurden Substituenten ausgewählt, die zu dieser Wechselwirkung fähig sind (Indol, Guanidinium und Phenylalanin). Auch hier wurde die Interaktion der unterschiedlich substituierten DNA-Pools mit den Target-*Beads* untersucht (Abb. 69). Für eines dieser SELEX-Experimente wurde der Pool mit Indol- und für das zweite SELEX-Experiment mit Guanidiniumazid modifiziert. Die Substituenten wurden vor jedem Inkubationsschritt mittels Kupfer-katalysierter Reaktion (Abb. 16) in den einzelsträngigen DNA-Pool eingefügt. Nach der Reinigung wurde die DNA mit dem Target bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde zusätzlich präselektiv mit Cyaninmolekülen (Cy5) versehen, um so Bindungsverluste während der DNA-Detektion zu vermeiden. In beiden SELEX-Experimenten wurde der Selektionsdruck gleichmäßig gesteigert (Tab. 61 und Tab. 62). Dies geschah durch Reduktion der Menge eingesetzter Target-*Beads* bei gleichzeitiger Erhöhung der Menge eingesetzter IgG-*Beads* (negative Selektion). Außerdem wurde ein anderes DNA-Pool, welches mit den gleichen Substituenten modifiziert wurde (*Click*-Kompetitor; Tab. 3 und Tab. 9) der Selektionslösung zugesetzt (50-100 pmol), um unspezifische DNA-Binder auf den Zelloberflächen zu blockieren. Zusätzlich diente die Erhöhung der Waschschrte und des Waschvolumens der Entfernung weniger spezifischer Nukleinsäuren aus dem Selektionspool. Mit Indol-substituierten DNA-Pools wurden acht und mit Guanidinium neun SELEX-Runden durchgeführt. Mit den Pools aus den letzten Runden sowie mit der Ausgangsbibliothek wurde eine durchflusszytometrische Bindungsstudie durchgeführt. Wie in Abb. 70 dargestellt, war bei den untersuchten Konzentrationen (Indol 250 nM und Guanidinium 175 nM) kein Selektionserfolg zu verzeichnen.

Zell-SELEX mit HT-29-Zellen

Bei dieser Zell-SELEX wurden HT-29-Zellen ausgewählt, weil sie eine höhere Affinität gegenüber dem verwendeten ML-5 Antikörper besaßen als die vorher genutzten HCT116 Zellen (Abb. 63). Um den Oligonukleotiden eine möglichst konstante Oberfläche anzubieten und eine unspezifische Internalisierung zu inhibieren, wurden

ERGEBNISSE

die Aptamere bei 4 °C selektiert. Bei dieser Temperatur wird das dynamische Expressions-Verhalten der Zellen unterdrückt. Während der SELEX wurde der Selektionsdruck sukzessiv erhöht (Tab. 41).

Tab. 41: Übersicht über die Bedingungen während der SELEX-Runden sowie die Anzahl sich ergebender PCR-Zyklen. Um von Runde zur Runde einen höheren Selektionsdruck zu erreichen, wurden die folgenden Parameter ausgewählt (x: Verwendung; -: keine Verwendung von Zelllinie oder von IDA-Aptamer in der jeweiligen SELEX-Runde; kd: *Knockdown*).

R	HT-29	CD24 kd	Wasch-schritte (V = 2.5 mL)	c NaCl [mM]	HT-29	CD24 kd	m IDA [ng]	m Pool [ng]	PCR -Zyklen
					Inkubationszeit [h]/ Wachstumsfläche [cm ²]*	Inkubationszeit [h]/ Wachstumsfläche [cm ²]*			
1	x	-	0	5	2 / 75	-	-	740	2
2	x	-	1	5	2 / 75	-	-	430	4
3	x	x	2	5	2 / 25	2 / 9	-	450	10
4	x	x	4	5	2 / 25	2 / 25	-	410	7
5	x	x	6	50	1 / 25	2 / 25	-	404	9
6	x	x	8	50	1 / 22	1 / 75+1 / 25	-	424	9
7	x	x	10	100	1 / 22	2x 2 / 75	-	380	18
8	x	x	12	100	0.5 / 22	2x 2 / 75	-	350	16
9	x	x	14	150	0.5 / 22	2x 2 / 75	235	230	22
10	x	x	16	150	0.5 / 9	2x 2 / 75	470	230	16
11	x	x	18	150	0.5 / 9	3x 2 / 75	470	210	15
12	x	x	20	150	0.5 / 9	3x 2 / 75	820	120	15

* bei 80% Konfluenz

Die Inkubationszeiten mit HT-29-Zellen (positive Selektion) wurden verkürzt und die Inkubationszeiten mit HT-29 CD24 kd-Zellen (negative Selektion) verlängert. Auch die Erhöhung der NaCl-Konzentration wurde schrittweise bis zum Erreichen eines physiologischen Wertes (150 mM) vorgenommen.¹⁰⁴ Darüber hinaus wurde von Runde zu Runde die Menge an Zielzellen reduziert und eine höhere Anzahl von *Knockdown*-Zellen der Bindung mit den Oligonukleotiden ausgesetzt. Da Integrine, insbesondere $\alpha 6$ -Integrin (CD49f⁺), auf der Oberfläche von HT-29-Zellen stark produziert werden, wurde das Integrin-spezifische DNA-Aptamer IDA zugefügt, um eine Selektion für dieses Molekül zu vermeiden.^{62,158} Um auch andere potenzielle unspezifische DNA-Bindungen zu blockieren, wurde zusätzlich noch kompetitive DNA (Heringssperma) und BSA der Selektionslösung zugesetzt. Nach jeder SELEX-Runde wurde die Menge präparativer PCR-Zyklen ermittelt. Dabei wurde immer eine

ERGEBNISSE

möglichst hohe Zyklenzahl gewählt, bei der jedoch noch keine Nebenproduktbildung zu beobachten war. Nach der Amplifikation wurde die Oligonukleotid-Lösung von PCR-Bestandteilen gereinigt und die Konzentration der Nukleinsäurelösung mittels NanoDrop ermittelt. Basierend darauf wurde der enzymatische Abbau des 5'-phosphorylierten Stranges mit Lambda-Exonuklease (4.2.1.2) durchgeführt. Der Erfolg der Generierung der ssDNA-Pools wurde mittels PAA-Gelelektrophorese (4.2.2.1) kontrolliert. Anschließend wurde der so generierte ssDNA-Pool denaturiert und langsam auf 4 °C abgekühlt. Dabei sollten sich die stabilen räumlichen Strukturen der einzelnen DNA-Moleküle ausbilden können. Die SELEX wurde nach 12 Runden beendet, da trotz des erhöhten Selektionsdruckes (mehr *Knockdown*-Zellen und längere Inkubationszeiten mit *Knockdown*-Zellen, höhere Konzentration an IDA und Reduktion der Menge an Nukleinsäurepool) die Anzahl an benötigten PCR-Zyklen in den letzten drei Runden konstant blieb (Tab. 41). Um den Selektionserfolg zu untersuchen, wurden vier DNA-Pools ausgesucht (Pool: 1, 6, 10 und 12). Hierbei diente der gering angereicherte Pool 1 gleichzeitig als Negativkontrolle. Zuvor wurden die Pools in einer PCR-Reaktion am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert (FITC; 4.2.1.1). Nach der Einstellung der Konzentration der DNA-Lösung auf 450 nM wurden die Pools der Bindung an die HT-29- und die HT-29 CD24 kd -Zellen ausgesetzt (Abb. 23). Dabei wurde eine Zunahme der Pool-Affinität (Abb. 23) gegenüber den Targetzellen mit steigenden SELEX-Runden beobachtet. Dagegen blieb die Affinität der Pools gegenüber den *Knockdown*-Zellen konstant niedrig.

ERGEBNISSE

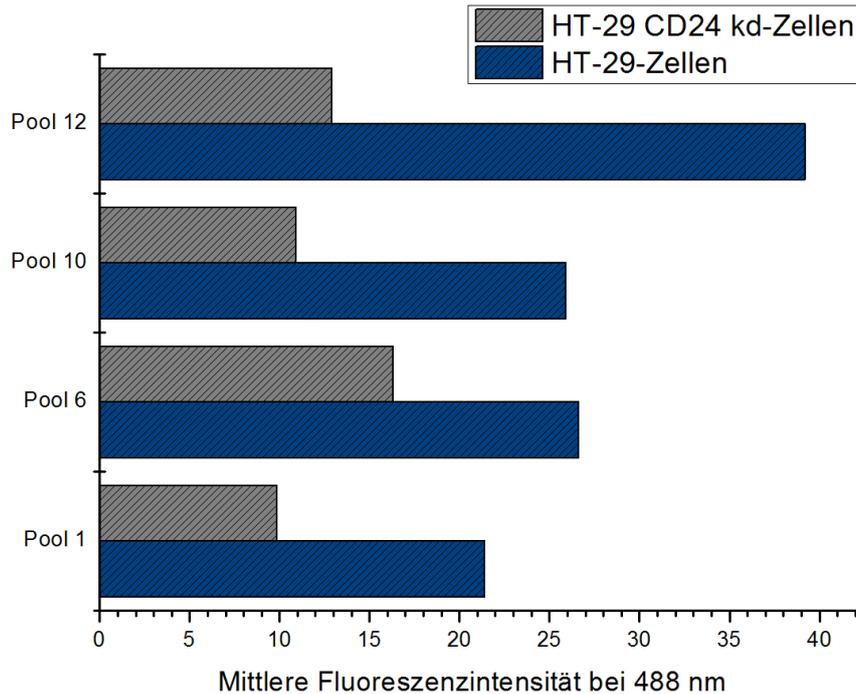


Abb. 23: Bindungsstudie der DNA-Pools aus unterschiedlichen Zell-SELEX-Runden. Affinitätsstudien der DNA-Pools aus den Runden 1, 6, 10 und 12 mittels durchflusszytometrischer Messung ($n=1$). Hierbei wurde neben der Affinität der DNA-Pools an HT-29- (blau) auch die Affinität an die HT-29 CD24 kd-Zellen gemessen.

Diversitätsassay zur Überwachung der SELEX-Entwicklung

Um die Progression der SELEX zu bewerten, wurde ein zusätzlicher einfacher und kostengünstiger Assay entwickelt. Hierbei handelte es sich um eine Abwandlung der Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Komplexität der SELEX-Pools (Tab. 21).^{159,160} Die jeweiligen DNA-Pools wurden zunächst in zehn PCR-Zyklen amplifiziert, um Amplifikate mit ausreichender Qualität zu erhalten. Da die DNA-Pools keine Überamplifikate aufwiesen (10%ige native PAGE; 4.2.2.1), konnten so generierte DNA-Pools für den Diversitätsassay eingesetzt werden. Zunächst wurde die Schmelztemperatur der jeweiligen DNA-Pools bestimmt. Dies erfolgte in einem qPCR-Cycler unter Zugabe des SYBR-Green-Interkalations-Farbstoffes. Um Veränderungen in der Diversität der DNA-Pools zu bewerten, wurde die Breite der Temperaturschmelzpeaks für alle ausgewählten Pools vermessen. Dabei dienten die Breiten der Schmelzkurven der Startbibliothek und der einzelnen DNA-Spezies als Kontrollen (Abb. 24). Es ist ersichtlich, dass die stärkste Abnahme der Pool-Diversität nach der zweiten und zehnten Selektionsrunde zu verzeichnen war.

ERGEBNISSE

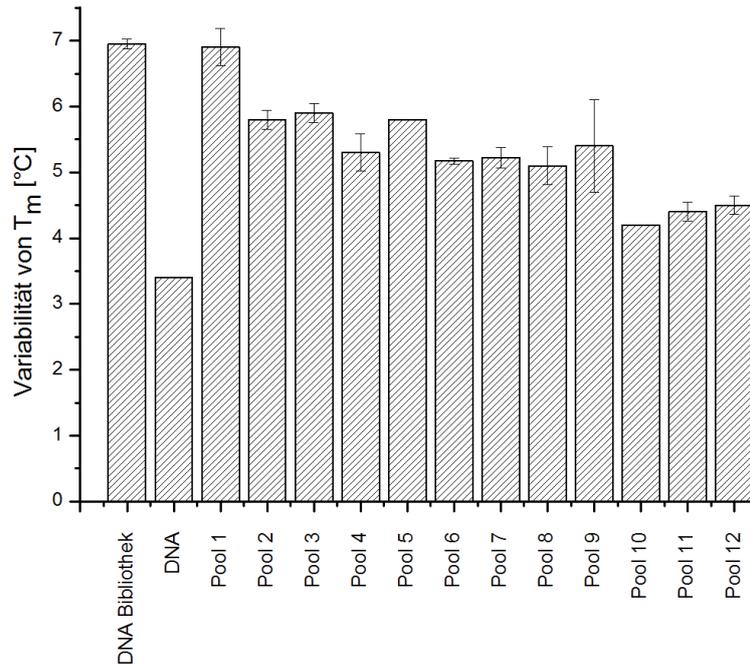


Abb. 24: Diversitätsassay zur Überwachung der SELEX-Entwicklung. Die Breite des Schmelztemperaturpeaks wurde für die Startbibliothek (DNA-Bibliothek); die Negativkontrolle (DNA), eine DNA mit der gleichen Länge wie die Moleküle in den DNA-Pools, sowie für alle SELEX-Pools (Pool 1- Pool 12) berechnet. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n=2$).

Dabei zeigte sich, dass alle SELEX-DNA-Pools anfällig für Überamplifikationen waren. So bildeten sich falsch hybridisierte DNA-Produkte, die eine um 15 °C niedrigere Schmelztemperatur besaßen (Abb. 25).

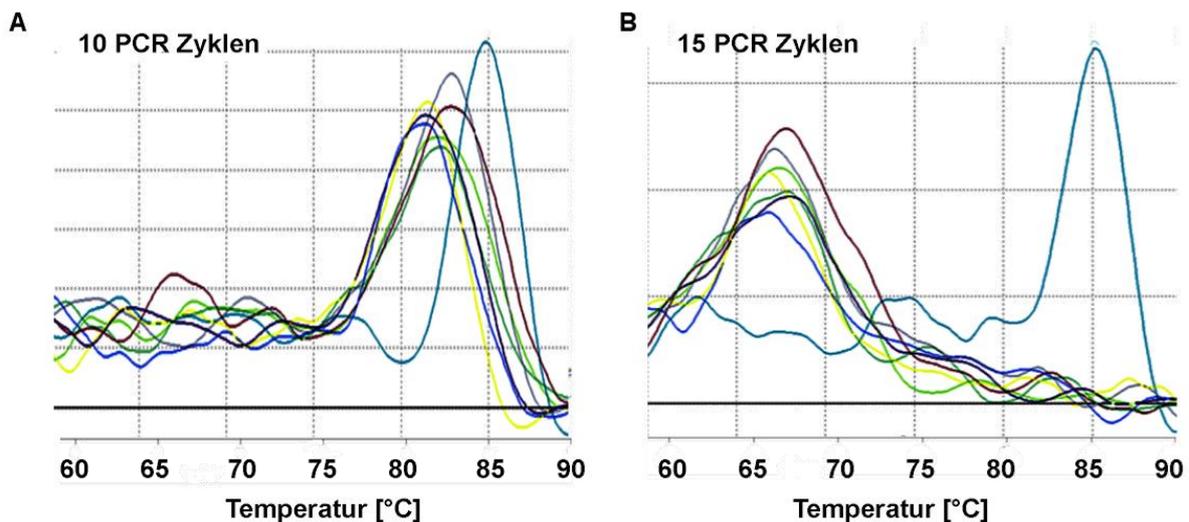


Abb. 25: Schmelzkurven der ausgewählten Selektions-Pools. Panel A: Amplifikationsprodukte nach 10 PCR-Zyklen und Panel B: nach 15 PCR-Zyklen. Die DNA-SELEX-Pools sind in diversen Farben dargestellt. Die Probe, die DNA-Moleküle mit den gleichen Sequenzen aufwies, ist hellblau dargestellt. Es wurde die Fluoreszenzintensität als Funktion der Temperatur dargestellt.

ERGEBNISSE

Die DNA-Moleküle aus der letzten Selektionsrunde wurden durch Klonieren vereinzelt (4.2.4.2). Die aus 59 positiven Kolonien erfolgreich isolierten Plasmide wurden von der Firma GATC sequenziert.⁵⁰ Die erhaltenen Sequenzen sind dem Anhang (Tab. 66) zu entnehmen. Der Ähnlichkeitsgrad der Sequenzen wurde mit der Web-basierten Applikation *Multalin* untersucht.¹⁶¹ Dabei zeigte sich eine Consensus-Sequenz von 16 Adenosinen und einem Cytosin (Abb. 77). Desweiteren waren die randomisierten Bereiche der Oligonukleotide 17 und 54 sowie 36, 49 und 63 identisch (Tab. 42). Die DNA-Sequenz mit der Nummer 60 unterschied sich von der wiederholten Sequenz der Oligonukleotide 36, 49 und 63 nur durch Depletion eines Adenosins. Die Nucleinsäuren mit der Nummer 2 und 5 wiesen an der 17ten Position unterschiedliche Pyrimidinbasen auf. Die restlichen 48 Sequenzen traten nur einmal auf. Zehn (17%) der 59 identifizierten DNA-Moleküle wichen in ihrer Basenzahl leicht von der Ausgangsbibliothek ab (Tab. 70, 40 ± 2 nt). Zusätzlich wurde bei zwei der Oligonukleotide auch eine Insertion von je einem Nucleotid im randomisierten Bereich festgestellt. Diese Ergebnisse wurden durch eine erneute Sequenzierung bestätigt.

Tab. 42: Gefundene identische oder ähnliche DNA-Moleküle. Sequenzen der Random-Regionen werden hier aufgeführt. Die zwischen den Oligonukleotiden unterschiedlichen Basenpositionen sind hervorgehoben.

Sequenz 5'→3'	DNA Nummer
TTAAAGAAACAAAGAATAAACATCACGATCGGCAACTCGA	17 und 54
GTACTATATGTCTATTCCCTATTAGTTAATTTATATTCTTA	36, 49 und 63
GTACTATATGTCTATTCCCTATT <u>A</u> GTTAATTTATATTCTTA	36, 49, 60 und 63
TATGTGGGTGGGTGGG <u>T/C</u> GGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT	2 und 5

Die Enthalpiewerte der 59 Oligonukleotide waren stabil und lagen zwischen -9.1 und -35 kcal/mol bei 4 °C und -2.5 bis -23 kcal/mol. Mit Hilfe des QGRS-Mapper wurden für die erhaltenen DNA-Moleküle auch die Wahrscheinlichkeiten zur G-Quadruplex-Bildung berechnet.¹⁶² Von den erhaltenden Oligonukleotiden sind potenziell 20 in der Lage diese Strukturen auszubilden (G-Scores zwischen 5 und 21, Tab. 43).

ERGEBNISSE

Tab. 43: Übersicht der 17 DNA-Moleküle, die G-Quadruplexe ausbilden können samt der dazugehörigen G-Scores.¹⁶²

G-Score	5	6	11	12	13	14	15	17	18	19	21
DNA-Nummer (CD24_)	43	35; 45	48	38; Blau; 68	54; 17	26; 74	24	41	69	52	2; 5

Dabei gibt es eine positive Korrelation zwischen der Höhe des G-Scores und der Wahrscheinlichkeit G-Quadruplexe (GQ) auszubilden (max. 21). Bei den wiederkehrenden Sequenzen der fünf Oligonukleotide (Tab. 42) können nur die Nukleinsäuren 17 und 54 GQ ausbilden (G-Score von 13). Außerdem wurde nach Sequenzmotiven innerhalb des Selektionspools nach der letzten SELEX-Runde mittels MEME-Applikation (Abb. 26, Tab. 44) gesucht.¹⁶³

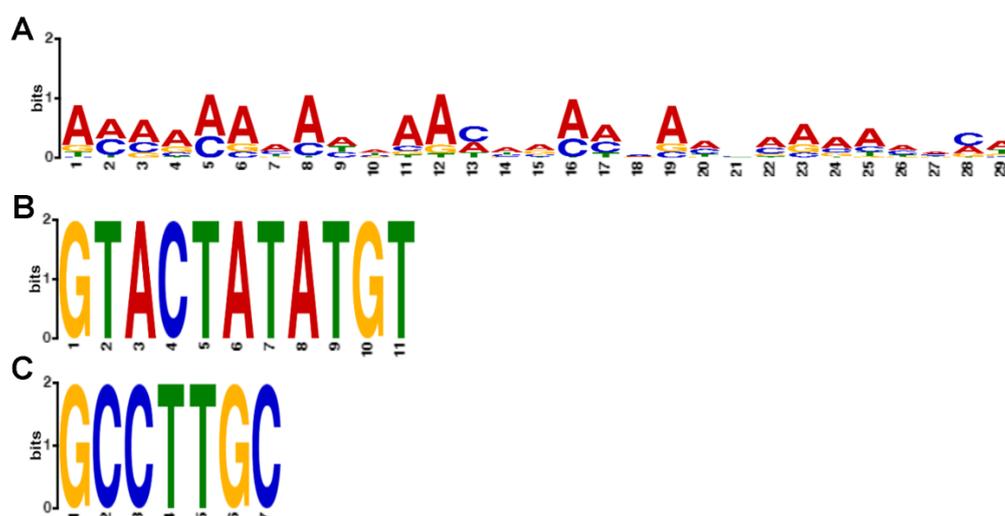


Abb. 26: Gemeinsame Sequenzmotive der DNA-Moleküle nach der SELEX für CD24. Panel A: Motiv 1_MEME_CD24; Panel B: Motiv 2_MEME_CD24; Panel C: Motiv 3_MEME_CD24.¹⁶³ Die X-Achse zeigt die Nummer des Nukleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

Die Ergebnisse zeigten, dass das erste Motiv in 51 von 59 Nukleinsäuren vorkam und das dritte Motiv nur bei zwei eng verwandten Nukleotiden (Tab. 42). Das zweite Motiv kam bei den drei sequenzidentischen Nukleinsäuren vor.

Zunächst wurden diejenigen DNA-Moleküle analysiert, die eine der ersten beiden Motive in ihren Sequenzen trugen.

ERGEBNISSE

Tab. 44: Struktur motive der DNA-Moleküle nach der SELEX für das CD24-Protein. Die Analyse erfolgte mittels MEME *Suite*.¹⁶³

Motiv	Strang	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_CD24	+	1; 7; 8; 9; 16 ;17; 18; 19; 20; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 38; 39; 40; 41; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 50; 52; 54; 56; 57; 58; 59; 61; 62; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 72; 74
	-	2; 5; 6; 36; 49; 60; 63
Motiv 2_MEME_CD24	+	36; 49; 63;
Motiv 3_MEME_CD24	+	5; 2

+ Das Motiv wurde in der Ausrichtung gefunden, in der es in der Abbildung dargestellt wurde. - Das Motiv wurde in der reversen und komplementären Ausrichtung in der DNA-Sequenz gefunden.

Für die nachfolgenden Bindungsstudien (4.5.7.1) wurden zunächst 18 DNA-Moleküle ausgesucht. Diese wurden radioaktiv markiert (4.2.1.3) und danach einer Bindung mit HT-29- bzw. HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen ausgesetzt. Hierzu wurden erst diejenigen Oligonukleotide gewählt, die identische Sequenzen aufwiesen (CD24_36, _49 und 63 sowie CD24_17 und _54). Desweiteren wurde die DNA mit der Nummer 60 untersucht, da sich diese von den restlichen Oligonukleotiden nur durch eine Depletion unterschied. Die DNA CD24_52 wurde ausgesucht, da sie unter den eng verwandten DNA-Molekülen die höchste Wahrscheinlichkeit aufwies, eine G-Quadruplex auszubilden (Tab. 43). Die Nukleinsäuren CD24_Blau; _40; _44; _26; _27; und _28 zeigten bei SELEX-Temperatur (4 °C) sowie bei RT die stabilsten Strukturen und wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Affinität zu den Targetzellen analysiert. Außerdem wurden die Oligonukleotide mit den Nummern: 22, 31 und 42 der Bindung mit den Targetzellen ausgesetzt, da sie den stabilen Oligonukleotiden verwandte Sequenzen aufwiesen. Zusätzlich wurde die DNA mit der Nummer 19 gewählt, da diese bei den beiden untersuchten Temperaturen (4 ° und 25 °C) die gleiche Strukturvorhersage hatte.

ERGEBNISSE

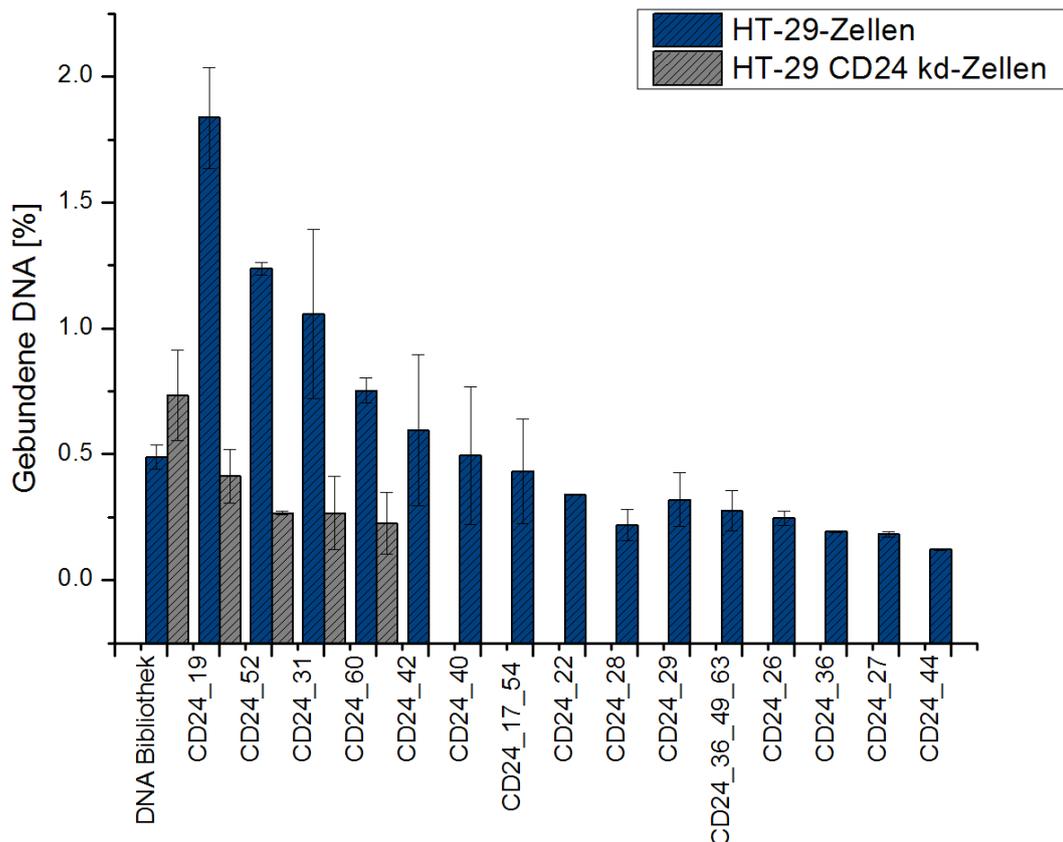


Abb. 27: Radioaktive Bindungsstudien der ausgesuchten Nukleinsäuren mit den HT-29-Zellen. (n= 2).

Die Ergebnisse des Bindungsassays (Abb. 27) zeigten, dass die Affinität der radioaktiv markierten DNA-Bibliothek gegenüber den HT-29- und HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen (Abb. 27) unverändert war. Das Oligonukleotid mit der Nummer 19 zeigte eine fast vierfach höhere Bindung gegenüber den Targetzellen im Vergleich zu der Ausgangsbibliothek. Auch die Nukleinsäuren 52, 31 und 60 zeigten eine höhere Affinität zu den HT29-Zellen im Vergleich zur Startbibliothek. Die Affinität der untersuchten Oligonukleotide zu den HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen blieb vergleichbar.

Im Folgenden wurde eine durchflusszytometrische Studie (4.5.7.2) durchgeführt. Verwendet wurden hier die besten Binder aus den Radioaktivitätstests (Abb. 27) sowie die zwei weiteren Oligonukleotide, die das dritte Motiv (Abb. 26, Tab. 44) in ihren Sequenzen trugen und gleichzeitig die höchste Wahrscheinlichkeit besaßen GQ (Tab. 43) auszubilden. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Nukleinsäuren spezifisch an die HT-29-Targetzellen gebunden haben (Abb. 28).

ERGEBNISSE

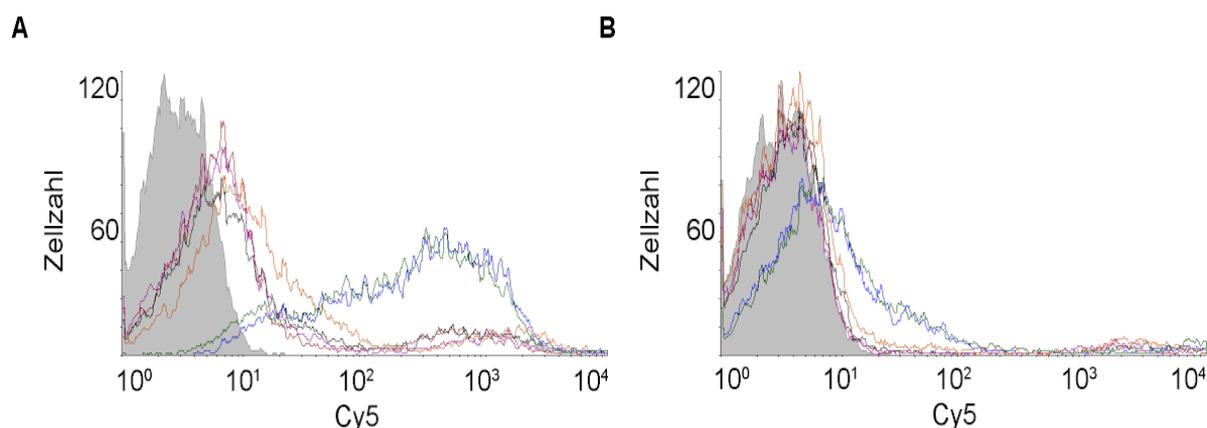


Abb. 28: Bindungsaffinität der ausgesuchten DNA-Moleküle. A: CD24-Molekül-produzierende Zellen (HT-29) und B: CD24 *Knockdown*-Zelllinie (HT-29 CD24 kd); CD24A_2 (blau), CD24A_5 (grün), CD24A_19 (rot), CD24A_31 (magenta), CD24A_52 (orange) und CD24A_60 (schwarz). Die Aptamere CD24A_2 und CD24A_5 zeigten eine sichtlich höhere Affinität zu den Zielzellen als die anderen vier Aptamerkandidaten. Die Autofluoreszenz der Zellen bei 647 nm ist grau dargestellt.

5.3 Charakterisierung der CD24-spezifischen Aptamere

Eine konzentrationsabhängige, durchflusszytometrische Studie wurde mit den spezifischen Bindern der Targetzellen (Abb. 27 und Abb. 28) durchgeführt. Anhand der Ergebnisse (Abb. 78) wurden die Dissoziationskonstanten zwischen den sechs jeweiligen Nukleinsäuren und CD24-präsentierenden Zellen berechnet (Gl. 5; Tab. 45).

Tab. 45: K_d -Werte der besten Zielzellenbinder. Die Dissoziationskonstanten wurden unter Verwendung von HT-29-Zellen bei 4 °C bestimmt. Es konnten sechs Aptamere identifiziert werden, deren Affinität zu den CD24-produzierenden Zellen zwischen 18 und 710 nM lag.

Aptamer	K_d bei 4 °C [nM]	ΔG bei 4 °C [kcal/mol]
CD24A_2	18.8 +/- 1.7	-20.13
CD24A_5	17.6 +/- 2.6	-19.36
CD24A_19	419.7 +/- 73.5	-12.25
CD24A_60	436.0 +/- 49.0	-11.24
CD24A_52	632.4 +/- 88.3	-13.76
CD24A_31	708.5 +/- 50.0	-14.23

Dabei zeigten die beiden Oligonukleotide mit der höchsten Affinität (Abb. 28) vergleichbare Ergebnisse. Die Resultate der Bindungsstudien mit den Target- und

ERGEBNISSE

Knockdown-Zellen werden hier für das Aptamer CD24A_2 exemplarisch dargestellt (Abb. 29).

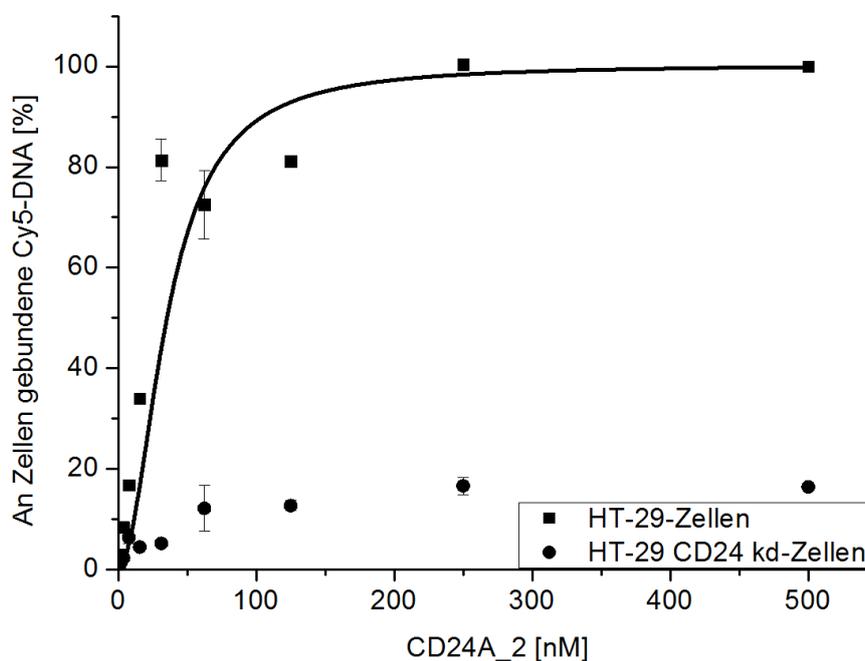


Abb. 29: Affinität des CD24A_2-Aptamers zu den HT-29-Zellen. Zunehmende Mengen an Aptamer (0.5 bis 500 nM) wurden mit 5×10^5 HT-29- oder mit den CD24 *Knockdown*-Zellen inkubiert. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt aus $n=2$ Messungen.

Die Sekundärstrukturen der beiden besten CD24-Molekül-Binder CD24A_2 und CD24A_5, die von der Mfold-Software vorhergesagt wurden, zeigten eine ähnliche Faltung und hohe Stabilität ($\Delta G = -35$ kJ/mol).¹⁶⁴ Für das CD24A_5 (sieben Strukturen bei 4 °C) wurden drei zusätzliche Strukturen vorhergesagt. Auch die Vorhersage bei 37 °C zeigte, dass beide Aptamere sehr stabile Strukturen ($\Delta G = -23$ kJ/mol) ausbilden können. Eine der Strukturen wurde für beide Aptamere (CD24A_2 und CD24A_5), sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C, vorhergesagt (Abb. 30).

ERGEBNISSE

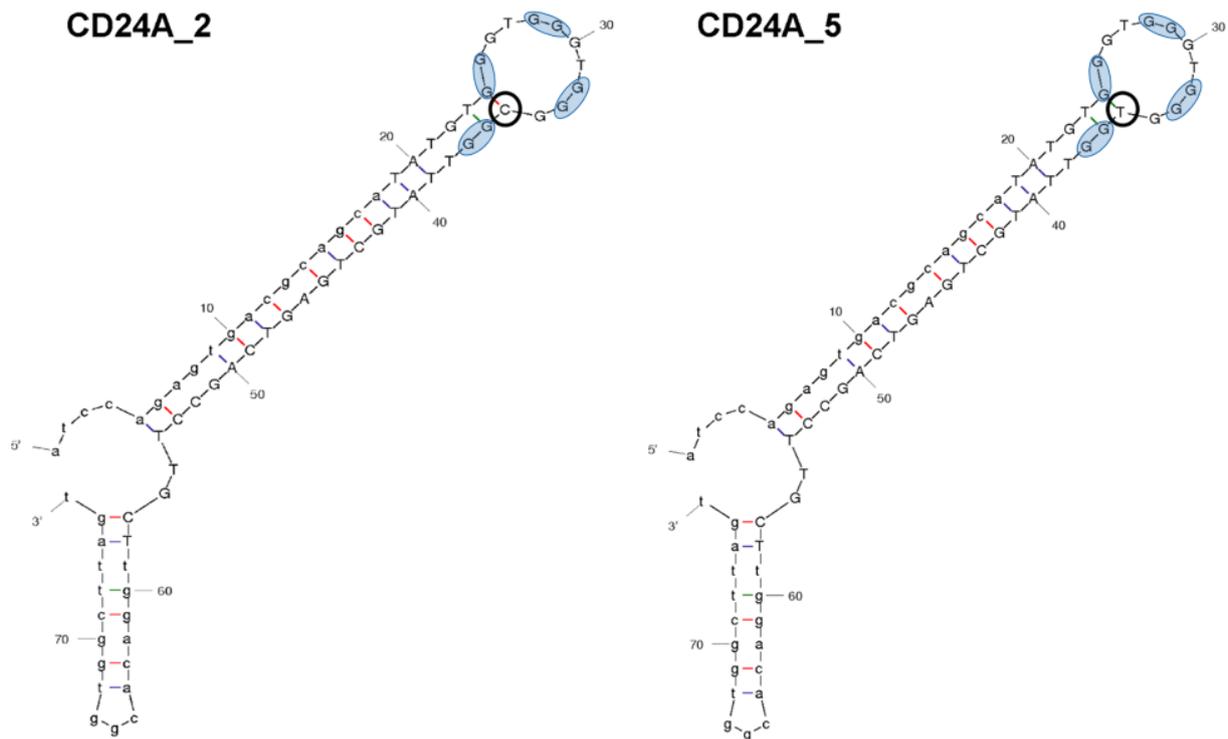


Abb. 30: Sekundärstrukturvorhersage der Aptamere CD24A_2 und CD24A_5 mit Hilfe der Mfold-Algorithmen.¹⁶⁴ Die dargestellten Strukturen wurden für die Aptamere sowohl unter SELEX-Bedingungen (4 °C) als auch bei 37 °C vorhergesagt. Der GQ kann möglicherweise innerhalb der oberen Schleife und mit zwei Guanosinen aus der Stamm-Struktur gebildet werden (blau hinterlegt; G24-25, G28-29, G32-33 und G36-37).

Des Weiteren wurde eine 3D-Strukturvorhersage mit Hilfe der Web-basierten Applikation SimRNA für die beiden Aptamere (CD24A_2 und _5; 4.5.3) durchgeführt.¹⁶⁵ Die 3D-Darstellungsform ermöglicht eine genauere Analyse der Aptamerstruktur. Hierbei können neben der Struktur auch die Ausrichtung und der Abstand der einzelnen Basen zueinander betrachtet werden.

ERGEBNISSE

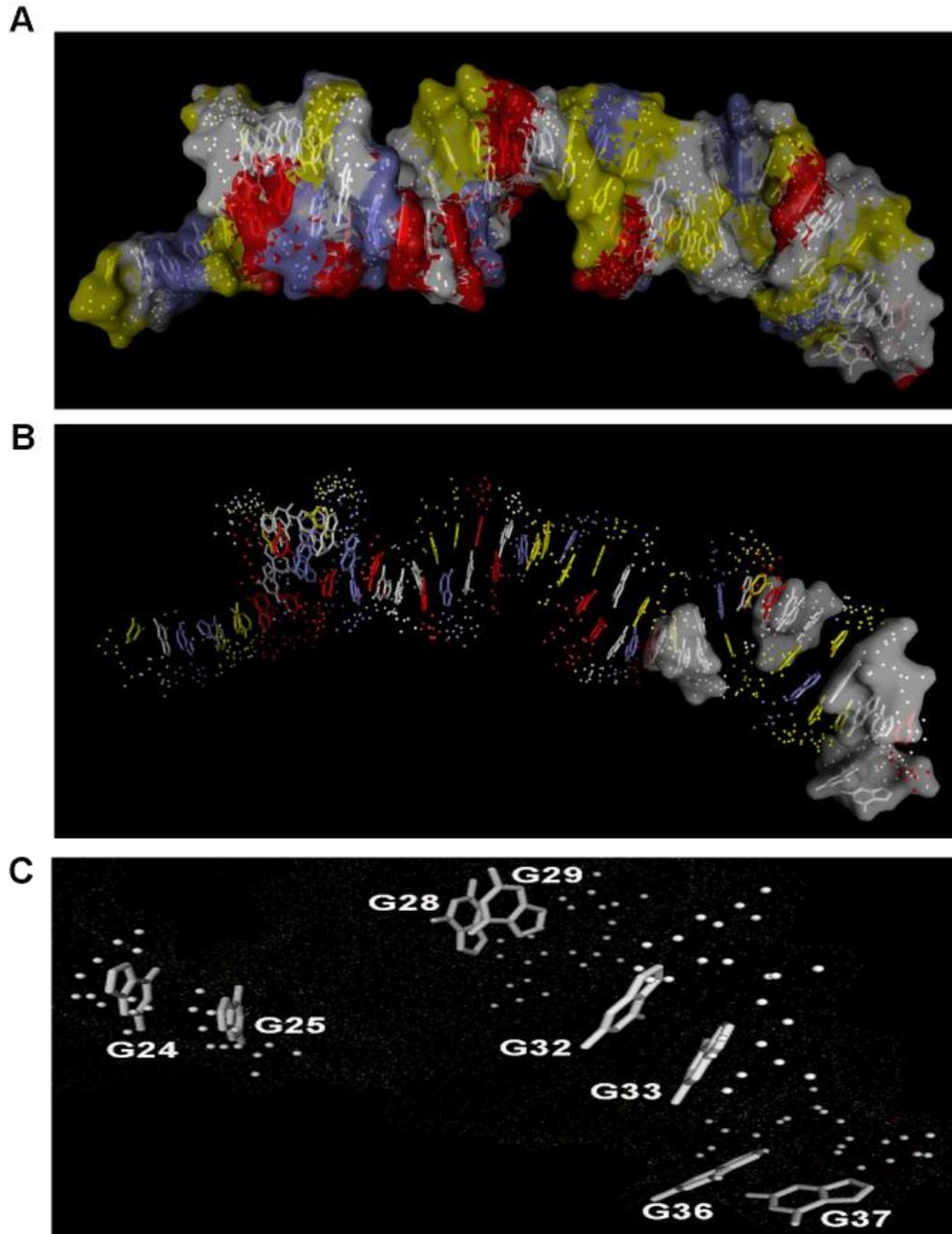


Abb. 31: 3D-Strukturvorhersage des Aptamers CD24A_2 mittels SimRNAweb.¹⁶⁵ Diejenigen Guanosine, die wahrscheinlich GQ ausbilden, sind grau hervorgehoben.¹⁶² Adenosine sind in violett, Thyminidine sind gelb und Cytidine rot hervorgehoben.

Die acht Guanosine, die potenziell GQ ausbilden können, wurden dabei in der 3D-Strukturvorhersage zusätzlich hervorgehoben (Abb. 31 und Abb. 32).¹⁶²

ERGEBNISSE

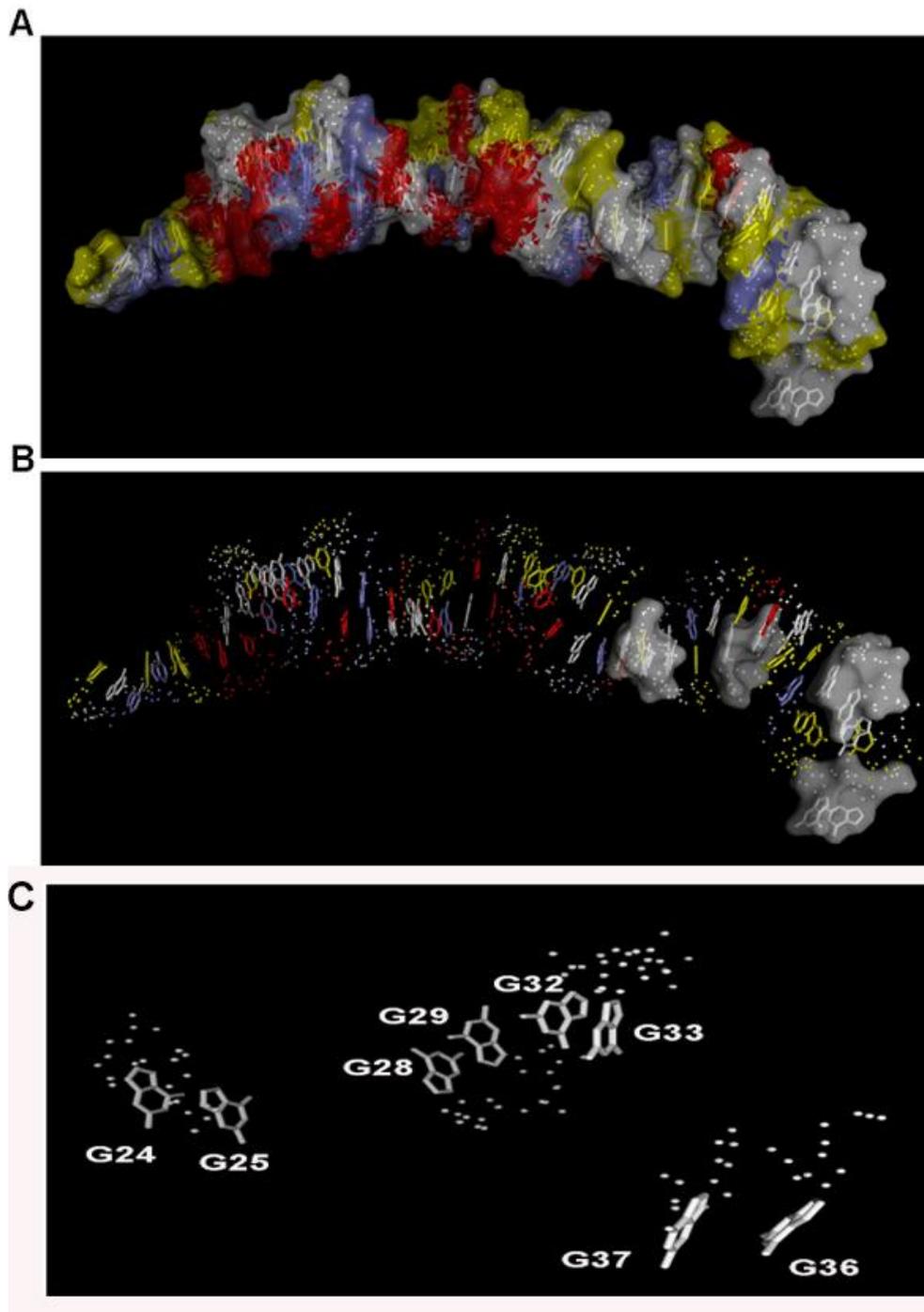


Abb. 32: 3D-Strukturvorhersage des Aptamers CD24A_5 mittels SimRNAweb.¹⁶⁵ Diejenigen Guanosine, die wahrscheinlich GQ ausbilden sind grau hervorgehoben.¹⁶² Adenosine sind in violett, Thyminde sind gelb und Cytidine rot hervorgehoben.

Eine gute Methode zur Strukturanalyse von Aptameren stellt die CD-Spektroskopie dar. Hierbei wird die Absorptionsdifferenz von links- oder rechtszirkular-polarisiertem Licht durch optisch aktive, chirale Moleküle detektiert. Durch Änderung der Amplitude ließen sich so die Strukturen der Nucleinsäuren wie z. B. der A-, B- und Z-DNA

ERGEBNISSE

ermitteln. Die Messung des Aptamers erfolgte im UV-Bereich (200-320 nm). Dabei sollte eine mögliche Ionenabhängigkeit der Struktur des Aptamers gezeigt werden. Es wurden vor allem solche Ionen getestet, die während der SELEX in den verwendeten Puffern enthalten waren. Der Mittelwert der 30 Spektren wurde kalkuliert und die entsprechenden Puffer-Spektren davon abgezogen. Abschließend wurde das resultierende Spektrum graphisch durch Auftragung der Elliptizität (mdeg) gegen die Wellenlänge (nm) visualisiert. Das Spektrum des CD24A_2 Aptamers (Abb. 33) zeigt zwei Maxima bei 220 nm und bei 265 nm sowie ein Minimum bei 245 nm.

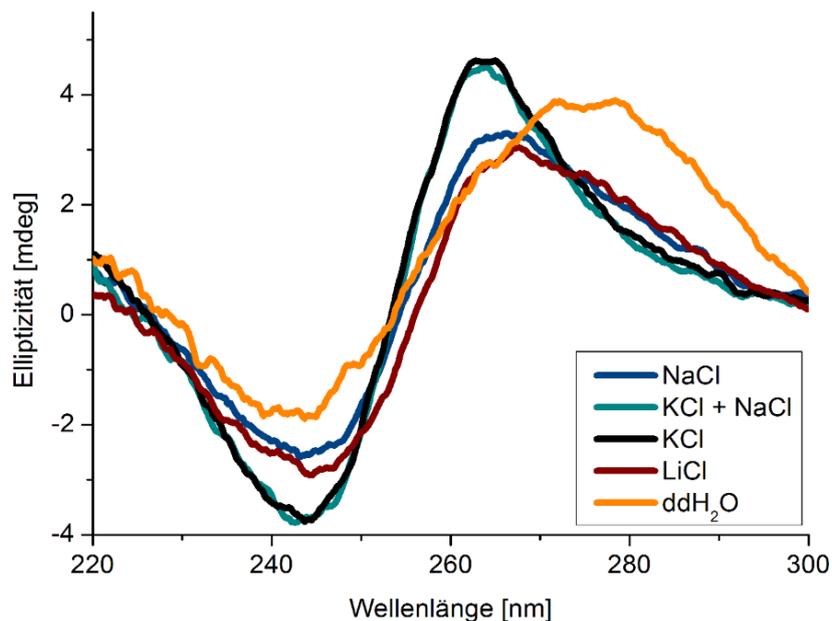


Abb. 33: CD-Messung zur Untersuchung der Ionenabhängigkeit der Struktur des CD24A_2-Aptamers. Das Aptamer wurde mit SELEX- Puffer versetzt und seine Fähigkeit das polarisierte Licht zu drehen wurde gemessen. Diese Eigenschaft wurde in Anwesenheit unterschiedlicher, monovalenter Ionen gemessen. Die dargestellten Spektren und die daraus abzuleitende GQ-Bildung unterschieden sich je nach Gegenwart von 150 mM einwertigen Ionen (Na⁺, K⁺ und Li⁺) signifikant voneinander. Zusätzlich enthielten die gemessenen Lösungen jeweils 1 mM Mg²⁺ und 1 mM Ca²⁺ in HEPES-Puffer, pH 7.4 (n= 30).

Die selektierten Aptamere CD24A_2 und _5 zeigten ähnliche Affinitäten zu ihren Zielmolekülen, sowohl unter SELEX-Bedingungen (4 °C) als auch bei physiologischer Temperatur (Abb. 28 und Abb. 34).

ERGEBNISSE

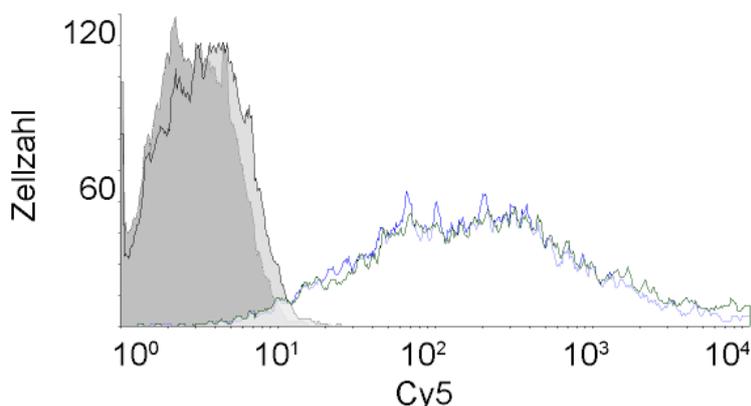


Abb. 34: Bindungsaffinität von CD24A_2 (blau) und CD24A_5 (grün) Aptameren zu der Oberfläche von HT-29-Zellen bei 37 °C. Die Bindung wird durch eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität pro Zellzahl dargestellt; Autofluoreszenz der HT-29-Zellen bei 4 °C (dunkelgrauer Bereich) und 37 °C (hellgrauer Bereich). Beide Aptamere zeigten ähnliche Bindungsaffinitäten zu den Zielzellen. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 647 nm gemessen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die GQ-Ausbildung temperaturabhängig ist und somit ob die Wechselwirkung mit den Targetzellen von diesen Strukturen abhängig sein könnte. Das resultierende CD-Spektrum ist in Abb. 35 dargestellt.

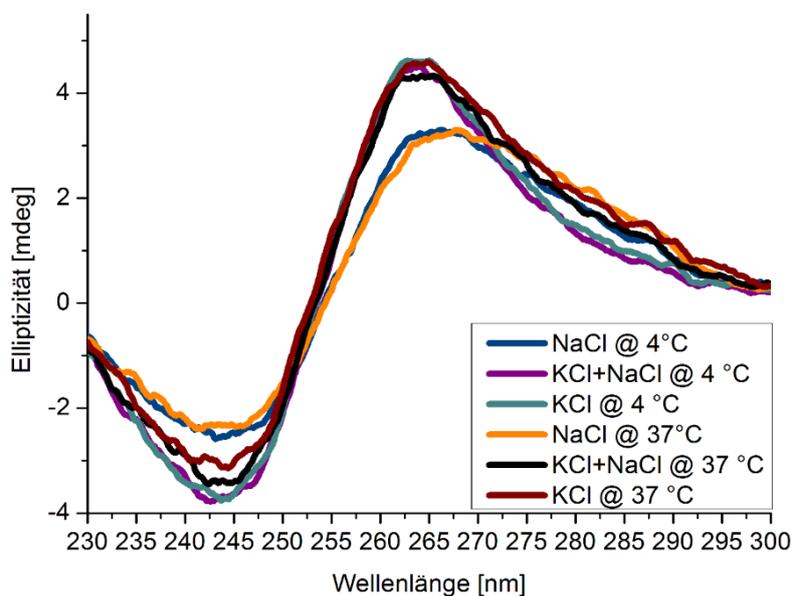


Abb. 35: Temperatureinfluss auf die Stabilität der GQ-Struktur des Aptamers CD24A_2. Kaliumionen stabilisierten die GQ-Struktur stärker als Natriumionen. Der Wechsel von 4 ° auf 37 °C zeigt nur einen geringen Einfluss auf die Aptamerfaltung.

Der Wechsel von 4 ° auf 37 °C zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Aptamerfaltung. Aus den CD spektrometrischen Untersuchungen ergab sich folgende Tendenz in der Stabilisierung der GQ im Aptamer CD24A_2: NaCl 37 °C > NaCl 4 °C > KCl 37 °C > KCl+NaCl 37 °C > KCl 4 °C = KCl+NaCl 4 °C.

ERGEBNISSE

Zusätzlich wurden die Affinitäten zu HT-29-Zellen zwischen dem Aptamer (CD24A_2) und dem Antikörper (Klon ML-5; Tab. 14) verglichen.

Aus Abb. 36 ist ersichtlich, dass die Affinität des Aptamers gegenüber den Targetzellen höher ist als die des verwendeten Antikörpers. Dabei resultiert die Bindung des Aptamers CD24A_2 an die Targetzellen (blaue, durchgezogene Linie) in einem 8.9fach höheren Fluoreszenzsignal als die des Hintergrundes (blaue, gepunktete Linie HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen). Bei dem Antikörper hingegen zeigte sich ein 6.7fach höheres Signal (HT-29, orange, durchgezogene Linie) gegenüber dem Hintergrund (HT-29 CD24 kd, orange, gepunktete Linie). Die höhere Bindung des Aptamers führt zu einer Sensitivitätssteigerung von 33% gegenüber dem Antikörper und somit zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis.

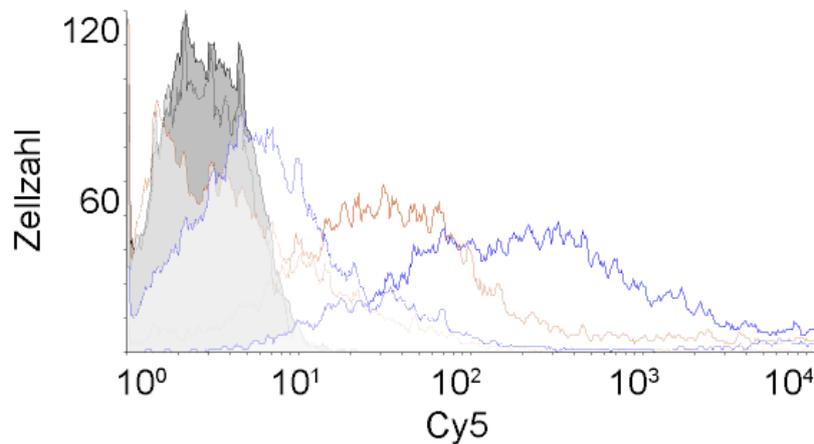


Abb. 36: Bindung des CD24A_2-Aptamers und des CD24-Antikörpers an HT-29- (durchgezogene Linie) und CD24 *Knockdown*-Zellen (gepunktete Linie). Die Inkubation des Oligonukleotides und des Antikörpers mit den Zellen erfolgte bei 4 °C. Die Bindung wird durch eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität pro Zellzahl dargestellt. Die Kurven für das Aptamer CD24_2 sind blau, während die Antikörperbindung orange dargestellt ist. Die Autofluoreszenz der HT-29-Zellen (dunkelgrau, durchgezogene Linie) und der *Knockdown*-Zelllinie (hellgrau und gepunktete Linie) wurde bei 647 nm gemessen.

Um weitere Einblicke in die Interaktionsstelle des Aptamers (CD24A_2) und seines Targets CD24 zu erhalten, wurde ein Konkurrenz-Bindungsassay (4.5.6) mit dem ML-5 Antikörper durchgeführt.

ERGEBNISSE

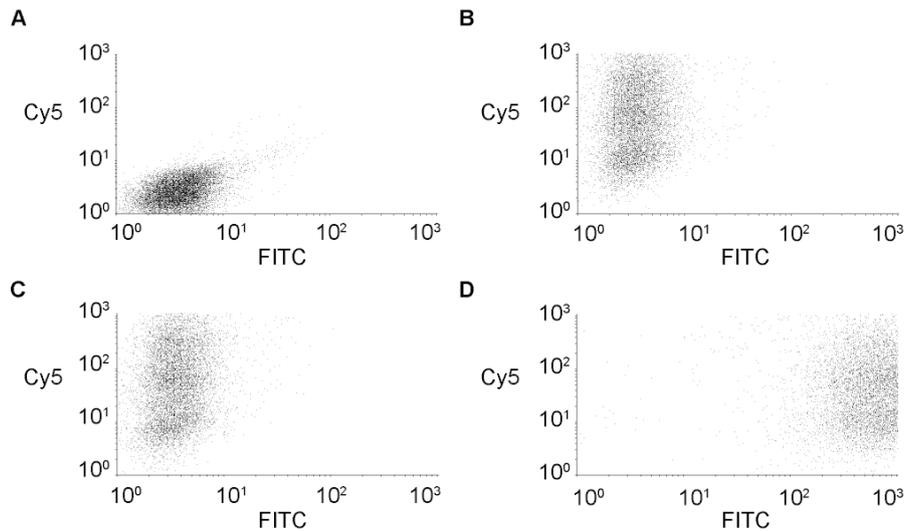


Abb. 37: Antikörper-Aptamer-Kompetitionstudie. Die Dot-Blots zeigen auf der x-Achse die Fluoreszenz im FL-1-Kanal (FITC; 488 nm) zum Nachweis sekundärer Antikörper und auf der y-Achse die Fluoreszenz im FL-4-Kanal (Cy5; 647 nm) zum Nachweis der Aptamer-Bindung. A: Autofluoreszenz der HT-29-Zellen; B: Verschiebung, die die Bindung des Aptamers CD24A_2 darstellt; C: Fluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit Aptamer und mit Primärantikörper; D: Verschiebung der Fluoreszenz von HT-29-Zellen nach Inkubation mit CD24A_2-Aptamer, Primärantikörper und dem Sekundärantikörper. Die Ergebnisse zeigen, dass das Aptamer nicht um die Bindung mit ML-5-Antikörpern konkurrierte.

Die durchflusszytometrischen Studien (Abb. 37) zeigten, dass die Bindung des Aptamers (Cy5-Kanal, Abb. 37, Panel B) nach der Zugabe des Primärantikörpers (Abb. 37, Panel C) erhalten blieb. Auch nach Zugabe des Sekundärantikörpers (Abb. 37, Panel D) konnte kein Rückgang in der Aptamer-Affinität gegenüber den HT-29-Zellen detektiert werden.

Um die Stabilität des Aptamers im Zellkulturmedium und seine Beständigkeit gegenüber Nukleasen zu testen, wurde das Oligonukleotid unterschiedlich lange im Medium oder in mit fetalem Kälberserum supplementierten Medium bei 37 °C inkubiert (4.5.1).¹⁶⁶ Um die Wanderung der Moleküle durch das Gel überwachen zu können, wurde zusätzlich Xylencyanol versetzter Probenpuffer als Referenz (Abb. 79 und Abb. 80, Spur R) mit auf das Gel aufgetragen. Dabei wurde beobachtet, dass dieser Farbstoff ein ähnliches Laufverhalten wie die 50-76 nt lange DNA hat. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einem Fluoreszenzkanal (Abb. 79 und Abb. 80) fotografiert. Das war möglich, da das untersuchte Aptamer am 5'-Ende mit einem Cy5-Molekül versehen war (Tab. 19). Die Auswertung der noch vorliegenden Mengen an Vollängen-DNA nach bestimmter Inkubationszeit erfolgte mit der Software ImageLab™ (Tab. 15). Nach dem Vergleich mit der DNA-Menge, die zum Zeitpunkt

ERGEBNISSE

Null vorlag, wurden die resultierenden prozentualen Mengen an Vollängen-DNA gegen die jeweilige Inkubationszeit geplottet. Wie in Abb. 79 zu sehen ist, waren nach vier Stunden im RPMI-Medium > 80% der Aptamere noch intakt (Abb. 79; Panel A, Spur h). Dagegen führte die Zugabe von fetalem Kälberserum dazu, dass zum gleichen Zeitpunkt (4 h) < 20% der Aptamermoleküle (Abb. 80; Panel A, Spur h) nicht abgebaut wurden. Nach einer 24-stündigen Inkubation blieben im RPMI-Puffer noch 40% des Aptamers (Panel B, Spur j) intakt. Eine hierzu vergleichbare Abnahme in der DNA-Menge konnte im FKS-haltigen RPMI-Medium (Abb. 80) bereits nach 30 Min. beobachtet werden. Nach der Quantifizierung der DNA-Mengen ergab sich für das Aptamer CD24A_2 eine Halbwertszeit von 1.6 h in FKS-haltigem Medium. Währenddessen fiel die Menge an intakter DNA im RPMI-Medium ohne Zusatz erst nach 20 h auf 50%.

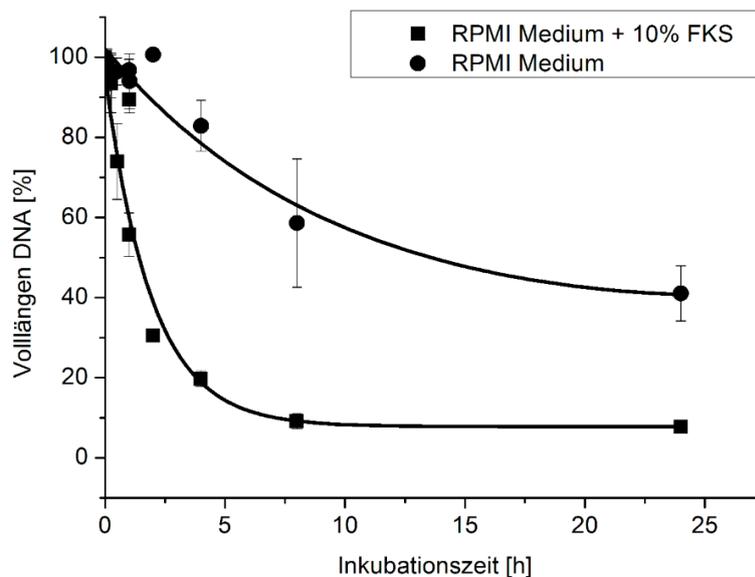


Abb. 38: Stabilität des Aptamers CD24A_2 in RPMI-Medium alleine (Punkte) oder versetzt mit 10% fetalem Rinderserum (Quadrate). Das CD24A_2-Aptamer wurde in beiden Medien 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30 Min. sowie 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden inkubiert. Die DNA-Mengen in den Proben wurden nach der Elektrophorese bei 647 nm nachgewiesen und mit der Software ImageLab™ quantifiziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (n = 2).

Zell-Internalisierungsstudie

Im Folgenden wurde eine Zell-Internalisierungsstudie mit dem Aptamer CD24A_2 durchgeführt. Hierzu wurde die 136 nM-Lösung des Aptamers mit dem Target und den *Knockdown*-Zellen inkubiert und mittels Durchflusszytometer vermessen (Abb. 81). Die Ergebnisse der Internalisierungsstudien sind in Abb. 39 dargestellt. Es wird

ERGEBNISSE

deutlich, dass die Zugabe von DNase zum Targetzellen-Aptamer-Komplex in einen Rückgang der mittleren Intensitätswerte resultierte. Wenn der Abbau nach Inkubation bei 4 °C durchgeführt wurde, wurde 7.5% Fluoreszenzintensität detektiert. Bei 37 °C war die Reduktion der Fluoreszenz durch die Einwirkung der Nuklease geringer und lag bei 31%. Bei den *Knockdown*-Zellen dagegen lagen die prozentualen Abnahmen in der Fluoreszenzintensität bei 10% und 76%. Allerdings war die gesamte Menge der detektierten Lichtintensität deutlich niedriger als bei den Targetzellen.

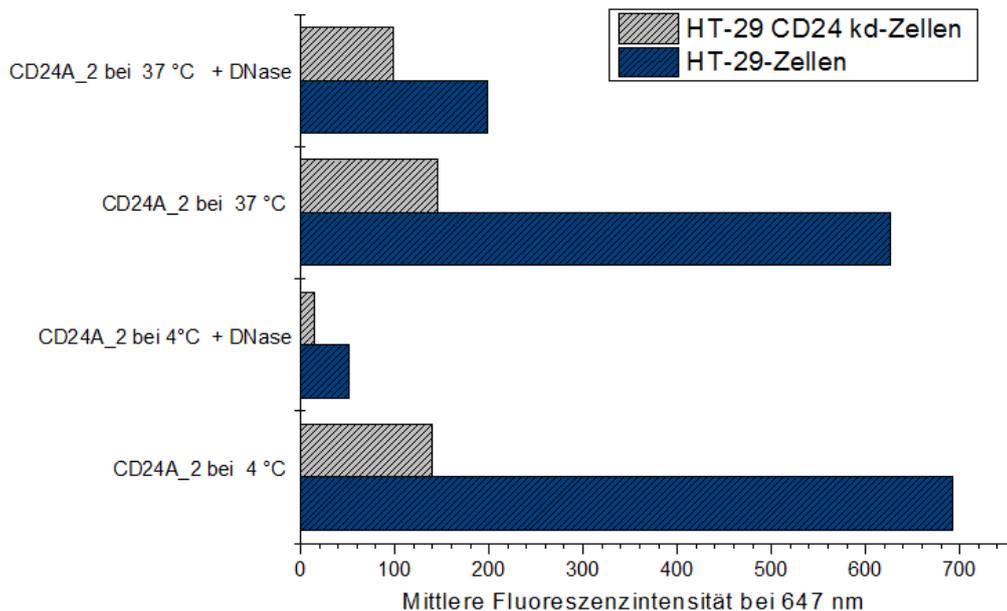


Abb. 39: Internalisierungsstudie des CD24A_2 Aptamers durch HT-29-Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit dem Aptamer sowohl bei 4 ° als auch bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine DNase-Behandlung der gebundenen Oligonukleotide. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Fluoreszenzintensität bei 647 nm (Cy5) an den HT-29-Zellen (blau) und CD24 kd-Zellen (grau) vermessen.

5.4 Selektion von Aptamern für CD54 (ICAM-1)

Die Selektion der Aptamere für das Molekül CD54 wurde ähnlich wie bei CD24 mittels einer Zell-SELEX durchgeführt. Als Target-produzierende Zellen dienten dabei HCT116 Kolonkarzinomzellen (Tab. 2, Abb. 72). Für die negative Selektion wurde die stabil transfizierte *Knockdown*-Variante (Tab. 2, Abb. 72) dieser Zelllinie verwendet. Dabei zeigten die regulären Kontrollen, dass die HCT116-Zellen bis zum Erreichen späterer Passagen (33) die Affinität gegenüber dem Antikörper beibehielten und dass

ERGEBNISSE

die Produktion des Targetproteins bei der CD54 *Knockdown*-Variante der HCT116-Zellen stabil unterdrückt wurde.

In diesem Selektionsprozess (Tab. 63) wurde die DNA zunächst im Bindungspuffer 5 Min. lang bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Diese Vorgehensweise sollte nur die stabilsten Formen der Nukleinsäuren dem SELEX-Prozess zur Verfügung stellen. Die Zellen wurden der Bindung mit Oligonukleotiden bei 37 °C ausgesetzt. Grund hierfür war es, Aptamere zu finden, die bei physiologischer Temperatur mit dem Target interagieren können. Bis Runde fünf wurde zu dem Bindungspuffer (DMEM-Medium) auch FKS (DMEM-Vollmedium) zugesetzt. Dies diente als zusätzlicher Kompetitor, um stabile Nukleinsäuren für diese Bedingungen zu finden. Die Inkubation erfolgte in Petrischalen (60x15 mm). Nach mechanischem Ablösen der Zelle vom Anzuchtgefäß wurden die Zell-DNA-Komplexe unter der Einwirkung von Hitze (10 Min. bei 95 °C) zerstört. Nach Zentrifugation wurden die sich im Überstand befindenden Nukleinsäuren amplifiziert. Der erste Amplifikationsschritt diente der Vervielfältigung derjenigen DNA-Moleküle, die sich in dem Eluat befanden. In der zweiten präparativen PCR wurde der bereits amplifizierte Pool für den nächsten SELEX-Schritt vervielfältigt. Die Affinität gegenüber Targetzellen und *Knockdown*-Zellen wurde zunächst für die Runden 5, 7 und 10 durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden DNA-Pools in einer PCR fluoreszenzmarkiert (Tab. 19; FITC). So generierte Nukleinsäure-Pools wurden mit den entsprechenden Zellen inkubiert und mittels Durchflusszytometer gemessen. Es zeigte sich, dass mit steigenden SELEX-Runden auch mehr Nukleinsäuren an die Zellen gebunden haben. Währenddessen blieb die mittlere Fluoreszenzintensität der *Knockdown*-Zellen (647 nm) und somit die Affinität der Pools gegenüber den Zellen konstant. Die Affinität gegenüber den Targetzellen war nach Runde 5 um das 2.2fache höher als gegenüber den *Knockdown*-Zellen (Abb. 40). Nach Runde 7 betrug der Affinitätsunterschied des Pools gegenüber den beiden Zelllinien das 2.6fache. Da die Differenz zwischen den *Knockdown*-Zellen und den Targetzellen nach der 10ten Runde um das 5.4fache gestiegen war, wurden noch drei weitere SELEX-Runden durchgeführt. Um mögliche Veränderungen der Nukleinsäurefaltungen in Folge der Modifikation mit den Fluoreszenzfarbstoffen auszuschließen, wurden radioaktive Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Pools aus den Runden 1, 7 und 13 radioaktiv markiert (4.2.1.3).

ERGEBNISSE

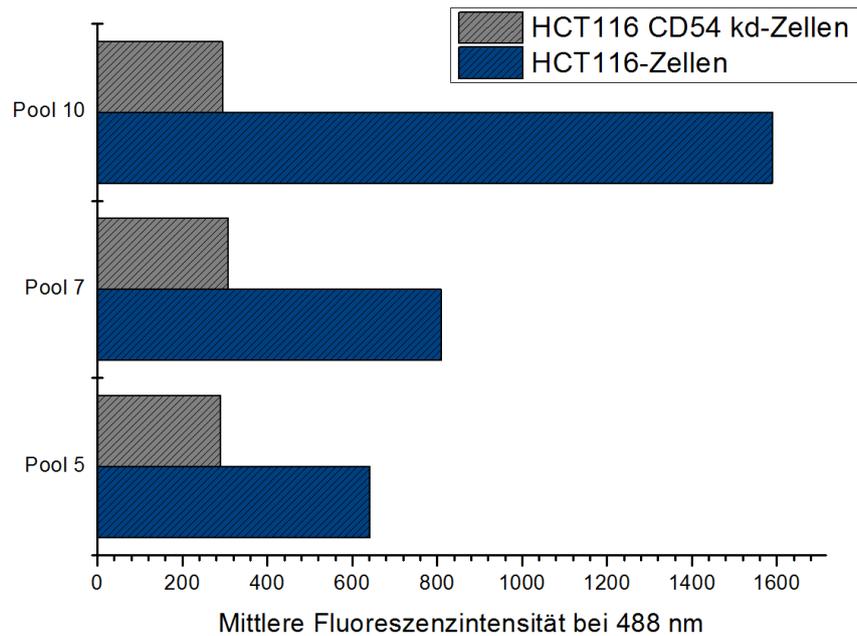


Abb. 40: Kontrolle der SELEX-Progression mittels durchflusszytometrischer Messung. Ergebnisse der Bindungsstudien für die Pools 5, 7 und 10 an HCT116-Zellen. Hierbei wurde die parentale Zelllinie HCT116 als Positivkontrolle und die HCT116 ICAM-1 *Knockdown*-Zellen als Negativkontrolle genutzt. Die Ergebnisse wurden mit den Werten der Ausgangsbibliothek bereinigt.

Auch hier hat sich bestätigt, dass die Pools aus den ansteigenden SELEX-Runden eine höhere Affinität gegenüber den Targetzellen aufwiesen. Die Affinität gegenüber den *Knockdown*-Zellen blieb konstant (Abb. 41).

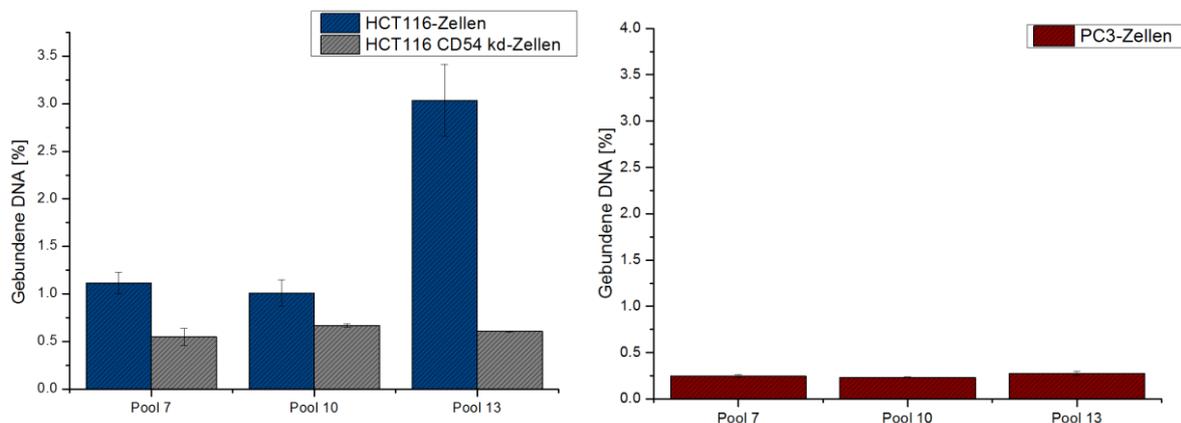


Abb. 41: Radioaktiver Bindungsassay zur Kontrolle der SELEX-Progression. Die dargestellten Daten wurden mit den Werten der Ausgangsbibliothek bereinigt.

Wenn die Nukleinsäuren zusätzlich der Bindung an die PC3-Zellen ausgesetzt wurden, konnten diese nicht mit den Zellen interagieren, obwohl diese auch das ICAM-1 Molekül trugen (Abb. 73). Nach der 13ten Runde wurden die Oligonukleotide durch Klonieren in einem *E. coli*-Stamm vereinzelt (4.2.4.2). Die Plasmid-Inserts von 50

ERGEBNISSE

Bakterienkolonien wurden in einer Sequenzierung identifiziert (Tab. 67). Der Vergleich zwischen den jeweiligen Oligonukleotiden zeigte eine Consensus-Sequenz bestehend aus fünf Nucleobasen (CTTTT; Abb. 83). Dabei wiesen 34% der DNA-Inserts eine von 40 Nucleotiden abweichende Länge auf (Tab. 71, 37-56 nt). Mit dem QGRS-Mapper konnten für 46% der Moleküle GQ (G-Score 6-20) vorausgesagt werden.¹⁶² Bei zwei dieser DNA-Moleküle (CD54_7; _45) war es möglich, dass sie gleichzeitig mehr als eine GQ-Struktur ausbilden können. Zwei der 50 DNA-Moleküle waren identisch (Tab. 72; CD54_47 und _49; 12). Die Mfold-Analyse der Sekundärstrukturen ergab bei den untersuchten DNA-Molekülen eine Stabilität von +0.05 bis -6.09 kcal/mol bei 37 °C (-2.79 bis -11.07 kcal/mol bei 25 °C).¹⁶⁴ Innerhalb der untersuchten Oligonukleotide wurden drei Sequenzabfolgen (Abb. 42) identifiziert.

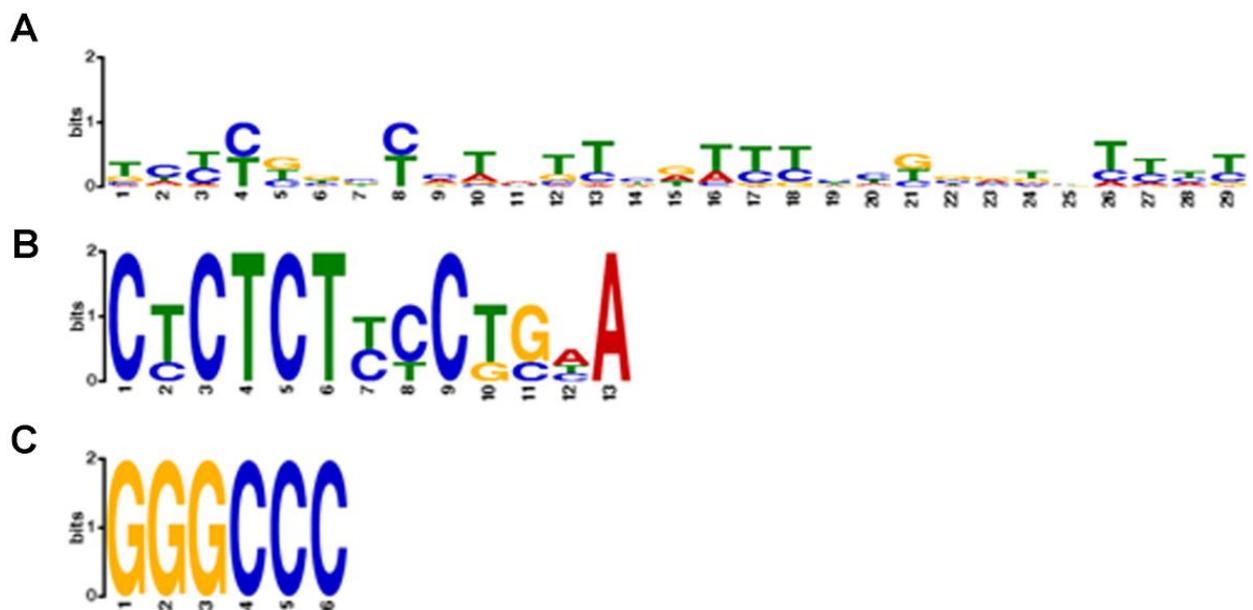


Abb. 42: Gemeinsame Sequenzmotive der Nucleinsäuren nach der SELEX für CD54. Panel A: Motiv 1_MEME_CD54; Panel B: Motiv 2_MEME_CD54; Panel C: Motiv 3_MEME_CD54.^{163 163} Die X-Achse zeigt die Nummer des Nucleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

ERGEBNISSE

Tab. 46: Gefundene Struktur motive bei 48 von 50 DNA-Molekülen. Die Analyse erfolgte mittels MEME Suite.¹⁶³

Motiv	Strang	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_CD54	+	1; 2; 5; 11; 12; 14; 15; 16; 17; 21; 22; 23; 25; 26; 27; 29; 31; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 54; 55; 56; 57; 58; 60
	-	53
Motiv 2_MEME_CD54	+	9; 24; 40
	-	28
Motiv 3_MEME_CD54	+	1; 32

+ Die Motivstelle wurde in der dargestellten Reihenfolge gefunden. - Die Motivstelle lag in revers-komplementärer Ausrichtung vor.

Für die Bindungsstudien wurden die Vertreter der drei Gruppen ausgesucht, die die Motive (Abb. 42) in der *forward* Ausrichtung hatten. Zusätzlich wurden Moleküle getestet, die GQs ausbilden können (Tab. 73), sowie solche, die stabile Strukturen laut Mfold-Strukturvorhersage aufwiesen. In Bezug auf die GQ-Bildung wurden Oligos aus der G-Score-Breite verwendet (Tab. 73; 6 bis 20; außer dem Score 20). Schließlich wurden zehn unterschiedliche DNA-Moleküle einem radioaktiven Bindungstest (4.5.7.1) unterzogen. Es ist ersichtlich, dass das Oligonukleotid mit der Nummer 45 die höchste Affinität gegenüber den Targetzellen aufwies. Dabei hatte dieses Oligonukleotid eine 2.2fach höhere Affinität zu den Targetzellen als zu den HCT116-Zellen, in denen die Expression des CD54-Moleküls mit Hilfe von shRNA-Technik herunterreguliert wurde (CD54 *Knockdown*-Zellen).

ERGEBNISSE

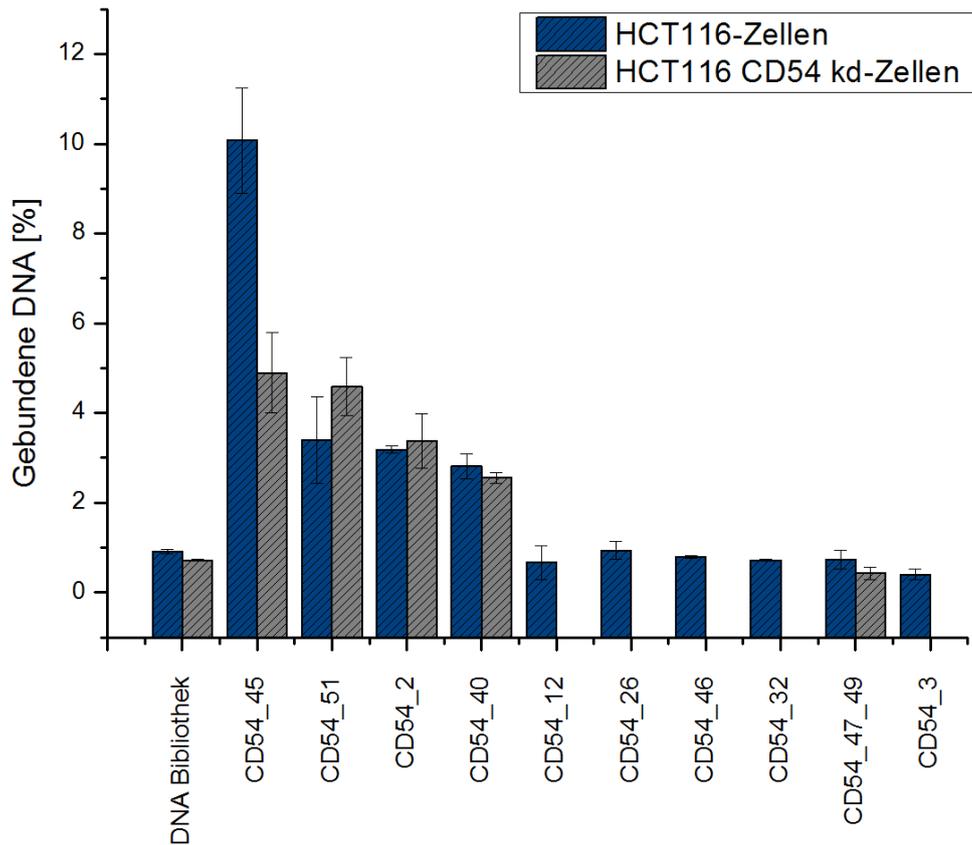


Abb. 43: Radioaktiver Bindungstest ausgesuchter Nukleinsäuren. Es wurden repräsentativ die Vertreter der drei Motiv-Gruppen getestet. Keines der Motive zeigte einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität zum Target. Bei den Oligonukleotiden mit der Nummer CD54_45; _51; _2; _40; 47 sowie _49 wurde zusätzlich die Bindung an HCT116 kd ICAM-1 Zellen überprüft (n= 2).

5.5 Selektion von Aptameren für das Embp Molekül

Bei der Selektion von Nukleinsäuren, die an das Embp-Molekül binden sollten, wurden zwei Target-Fragmente benutzt. Zum einen wurde das Embp125-Fragment des Embp Proteins als Target gewählt; dabei wurde auch eine kompetitive SELEX miteinbezogen. Zum anderen wurden zwei weitere SELEX-Verfahren angewendet, bei denen das Embp170-Fragment als Target diente.

E-SELEX

Die SELEX für das Embp125-Protein wurde als konventionelle SELEX durchgeführt. Dabei wurden die zuvor biotinylierten (Abb. 76) Target-Proteine sowie auch das humane Ligand von Embp (FNIII) auf Streptavidin-*Beads* immobilisiert (4.3). Der Selektionsdruck wurde durch Veränderung der Anzahl an Waschschrinen sowie des Waschvolumens angepasst (Tab. 65). Ab Runde zehn wurde eine kompetitive SELEX

ERGEBNISSE

durchgeführt. Hierzu wurde das an *Beads* immobilisierte FNIII erst mit dem in Lösung vorliegenden Embp125 inkubiert. Erst der gebildete Komplex wurde der Bindung mit den DNA-Pools ausgesetzt. Hierbei wurde auch die Konzentration an Magnesiumionen ab der Runde 11 halbiert (0.50-0.25 mM). Nach dem Einführen der Kompetitions-SELEX konnte ein deutlicher Rückgang in der PCR-Zyklenanzahl verzeichnet werden. Dies bedeutete, dass sich in dem Pool mehr DNA-Moleküle befanden als nach den vorherigen Runden. Somit haben mehr DNA-Moleküle an das Target gebunden bzw. wurden von dem Target eluiert, was wiederum auf eine Anreicherung des DNA-Pools deuten kann. Um die Affinität des Pools zum Target allein sowie zum Komplex zu testen, wurde ein radioaktiver Assay durchgeführt (Abb. 44). Dabei zeigte sich, dass die DNA-Pool-Affinität zu dem Protein allein (E125) wie auch zu dem Komplex aus Embp125 und FNIII höher war als zu den leeren magnetischen *Beads*. Diese Affinität stieg auch mit höherer Rundenzahl an. Somit lässt sich sagen, dass keine Anreicherung an unbeladene magnetische *Beads* erfolgte. Die Affinität zum FNIII-Embp125-Komplex unterschied sich dabei nicht von der Affinität zum Protein Embp125 allein.

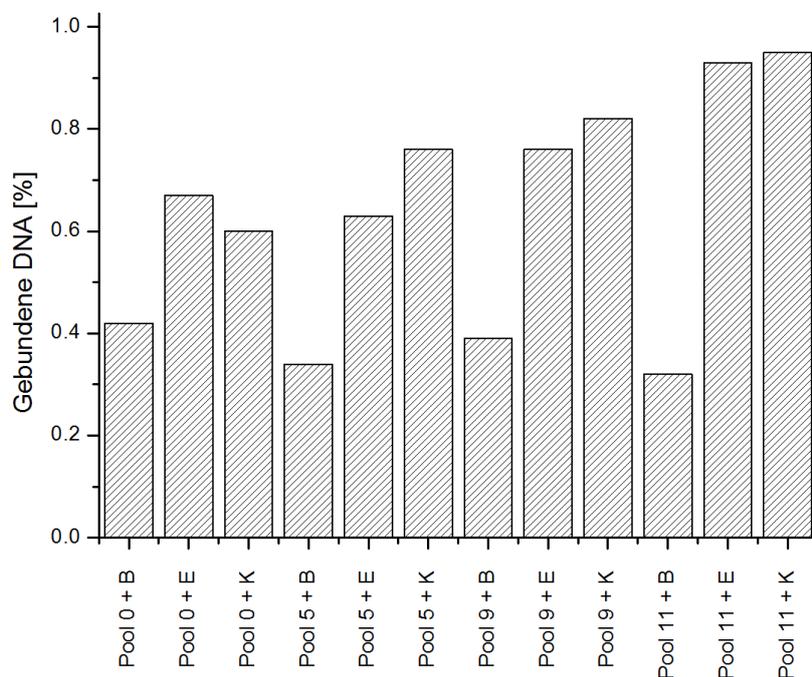


Abb. 44: Affinität der unterschiedlichen Pools zu leeren *Beads* (B), dem Protein Embp125 (E) und dem Komplex aus Embp125 und FNIII (K).

ERGEBNISSE

Um den Selektionserfolg zu evaluieren, wurde eine weitere radioaktive Bindungsstudie durchgeführt. Die mit Hilfe einer PCR radioaktiv generierten DNA-Pools (Tab. 24 und Tab. 25, Ausgangsbibliothek, Pool 10 und Pool 17) wurden der Bindung mit den Target-*Beads* ausgesetzt. Dabei zeigte sich eine dreifach höhere Bindung des letzten Pools im Vergleich zu Pool 10. Auch die Affinität des Pools 10 stieg um das zweifache im Vergleich zur Affinität gegenüber dem Ausgangspool.

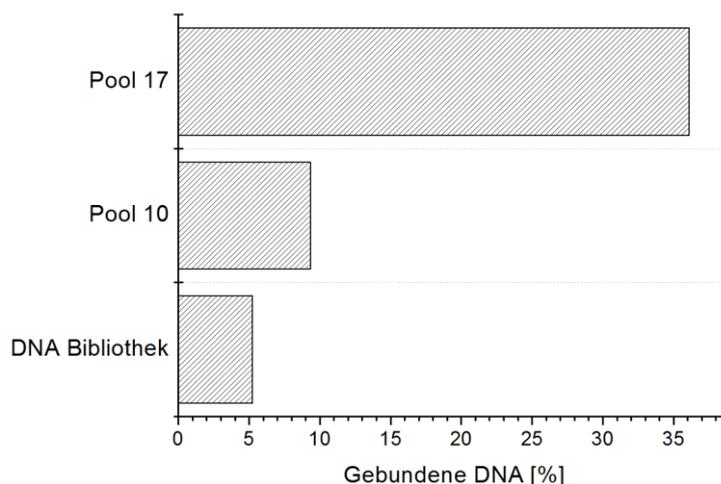


Abb. 45: Radioaktiver Bindungstest. Hierzu wurden die Pools mit Hilfe einer PCR unter dem Einbau von α - ^{32}P -dTTP radioaktiv markiert.

Nach dem Klonieren des Pools nach Runde 17 wurden Sequenzen von 38 DNA-Molekülen entschlüsselt (Tab. 68; Tab. 74). Die drei gemeinsamen Struktur motive sind in Abb. 46 dargestellt.

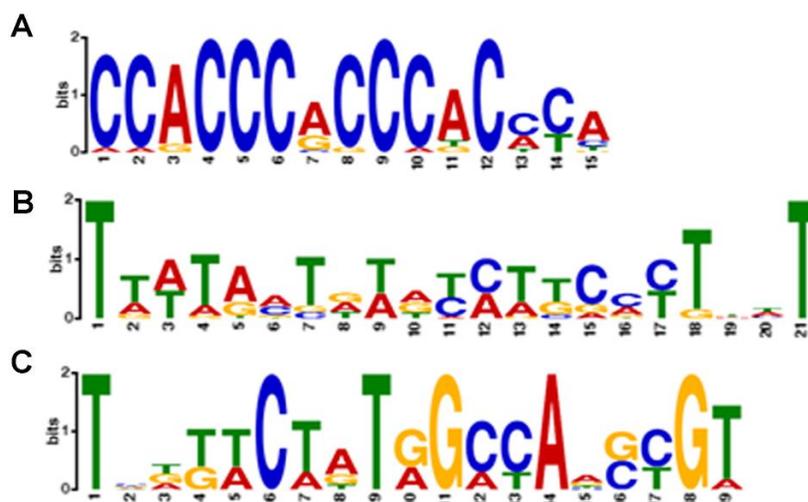


Abb. 46: Gemeinsame Sequenzmotive der 34 von 38 DNA-Molekülen nach der SELEX für Embp125. Panel A: Motiv 1_MEME_Embp125; Panel B: Motiv 2_MEME_Embp125; Panel C: Motiv 3_MEME_Embp125.¹⁶³ Die X-Achse zeigt die Nummer des Nukleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

ERGEBNISSE

Anders als bei den vorherigen SELEX-Pools zeigte sich hier, dass die DNA-Moleküle meistens aus zwei dieser Motive bestanden.

Tab. 47: Gefundene Struktur motive bei den DNA-Molekülen nach der SELEX für Embp125. Die Analyse erfolgte mittels MEME *Suite*.¹⁶³

Motiv	Strang	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_ Embp125	-	66; 69; 160; 161; 163; 166_Seq1; 169; 170; 170B; 171; 172; 173; 175; 176; 178; 179; 180; 181; 185; 186
Motiv 2_MEME_ Embp125	+	1; 66; 68; 70; 71; 79; 162; 164; 166_Seq1; 166_Seq2; 174; 175; 185
	-	72; 140_Seq1; 144; 163; 170; 183
Motiv 3_MEME_ Embp125	+	160; 161; 173; 178; 180; 181
	-	140_Seq1; 144

+ Die Motivstelle wurde in der dargestellten Reihenfolge gefunden. - Die Motivstelle lag in revers-komplementärer Ausrichtung vor.

Die ersten Studien zeigten, dass die Bindung zwischen den Nukleinsäuren und den Target-*Beads* stärker war, wenn gleichzeitig zwei und nicht eins der Motive vorhanden waren (Motiv 1 und 2 oder 2 und 3). Dabei kam die erste Motiv-Kombination bei sieben der Nukleinsäuren und die zweite bei elf Oligonukleotiden vor. Allerdings wurden keine ausreichend starken Binder gefunden.

Für die DNA-Moleküle nach der 17ten SELEX-Runde für das Embp125 Target wurden auch mittels *QGRS-Mapper* die Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung der GQ berechnet. Bei 23 Molekülen (66%) können sich GQ ausbilden. Dabei können sieben der Moleküle (20%) mehr als eine Quadruplex (2: E125_140_Seq2; 160, 170B, 172, 175 and 185; 3 G-Tetraden: E125_186) ausbilden.

Embp170

Bei der SELEX für das Fragment Embp170 wurden parallel zwei unterschiedliche SELEX-Verfahren durchgeführt. Eine SELEX war konventionell (im Folgenden als N-SELEX bezeichnet), bei der zweiten SELEX handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die konstanten Primer-Regionen während der Inkubationszeit durch Hybridisierung an komplementäre Oligonukleotide blockiert wurden (im Folgenden als C-SELEX bezeichnet). Die benötigte Anzahl an PCR-Zyklen war bei beiden SELEX-Pools

ERGEBNISSE

vergleichbar (Tab. 64). Da die Anzahl an PCR-Zyklen in den letzten Runden trotz der erhöhten Menge leerer *Beads* (negative SELEX) konstant blieb, wurde die Selektion nach Runde 17 beendet. Die DNA-Moleküle wurden vereinzelt (4.2.4.2) und zunächst mittels der Methode nach Sanger sequenziert (4.2.7.1).

C-SELEX

Um die Progression der SELEX zu untersuchen, wurde der in der vorliegenden Arbeit etablierte Diversitätsassay durchgeführt. Dabei war sichtbar, dass die DNA-Pools mit steigender SELEX-Runde immer homogener wurden, im Einklang mit der Anzahl benötigter PCR-Zyklen (Tab. 64).

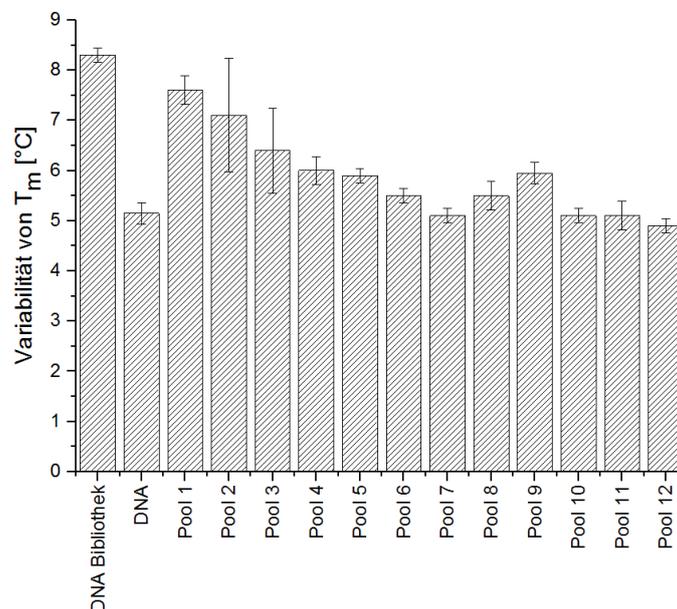


Abb. 47: Diversitätsassay zur Überwachung der C-SELEX-Entwicklung. Die Breite des Schmelztemperaturpeaks wurde für die DNA-Bibliothek berechnet; Negativkontrolle (DNA), z. B. eine DNA mit der gleichen Länge wie die DNA-Pools (Pool 1- Pool 12) aus entsprechenden SELEX-Runden. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n=2$).

Aus dem C-SELEX-Pool wurden 30 DNA-Moleküle sequenziert (Tab. 69; Tab. 77). Die resultierende Consensus-Sequenz war GT-reich (Abb. 86; GTGTGGTGGTGTGTGGGG). Die berechnete freie Enthalpie für die 2D-Struktur der 30 DNA Moleküle lag zwischen -7.5 und -14.6 (kcal/mol) bei RT und zwischen -4.4 und -10.4 (kcal/mol) bei 37 °C. GQs konnten in 63% der Nukleotide (19 Moleküle) ausgebildet werden.¹⁶²

Zwei der DNA-Moleküle, die sequenziert wurden, zeigten die selbe Sequenz (Tab. 76, E170_C_28 und E170_C_7).

ERGEBNISSE

Je höher der G-Score, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Nukleinsäure eine G-Tetrade ausbilden kann.¹⁶² Von den 19 Oligonuklotiden können sich bei sieben GQs ausbilden. Bei zwei der Moleküle (7%) konnten sich gleichzeitig mehrere GQs formieren (DNA 9C und 21C). Die Suche nach ähnlichen Sequenzmotiven ergab die folgenden drei Motive (Abb. 48).

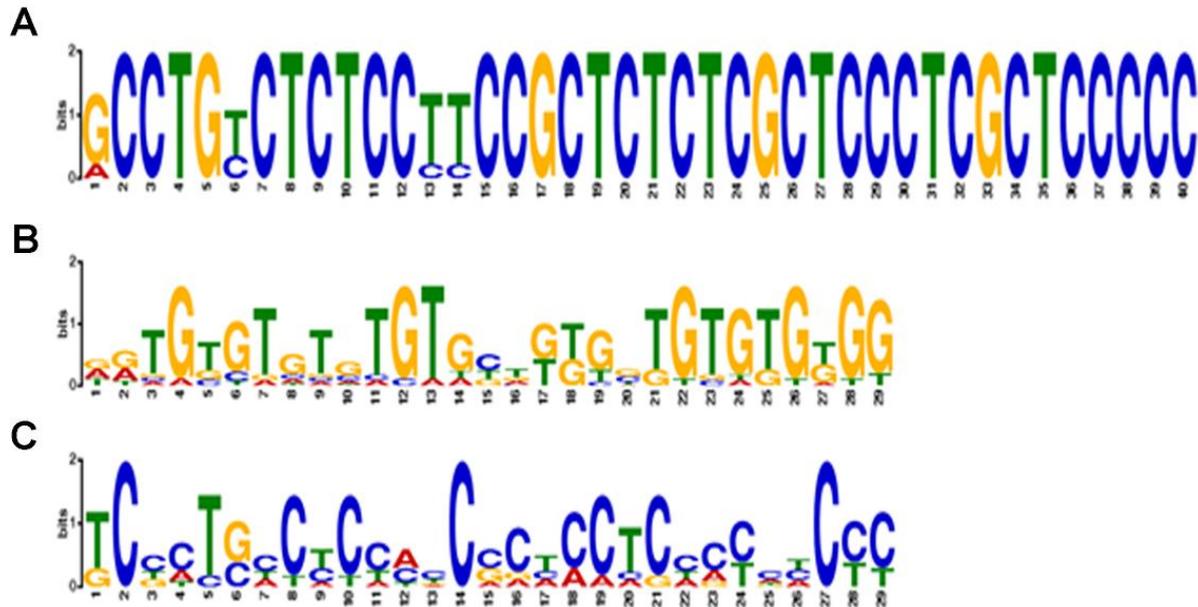


Abb. 48: Gemeinsame Sequenzmotive der selektierten DNA-Moleküle nach der C-SELEX für Embp170. Panel A: Motiv 1_MEME_E170_C; Panel B: Motiv 2_MEME_E170_C; Panel C: Motiv 3_MEME_E170_C. Die X-Achse zeigt die Nummer des Nukleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

Diese Motive wurden jeweils nur einmal pro Oligonukleotid gefunden. Das erste Motiv (40 nt) ist konserviert (36 nt); das Zweite (29 nt) ist durchgehend variabel. Bei dem Dritten (29 nt) zeigt sich die höchste Variabilität.

Tab. 48: Strukturmotive gefunden bei 28 (von 30) DNA-Molekülen. Die Analyse erfolgte mittels MEME Suite.

Motiv	Strang	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_E170_C	+	3; 6; 7; 13; 24; 28
Motiv 2_MEME_E170_C	+	1; 4; 11; 10; 15; 18; 19; 20; 22; 25; 24; 26; 27; 30
	+	2; 5; 6; 12; 14; 17
Motiv 3_MEME_E170_C	-	9; 23

+ Die Motivstelle wurde in der dargestellten Reihenfolge gefunden. - Die Motivstelle lag in revers-komplementärer Ausrichtung vor.

N-SELEX

Die Progression der SELEX wurde mit Hilfe des schnellen Diversitätsassays (Tab. 21) überprüft. Auch hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Diversität in den DNA-Pools und den benötigten PCR-Zyklen (Tab. 64).

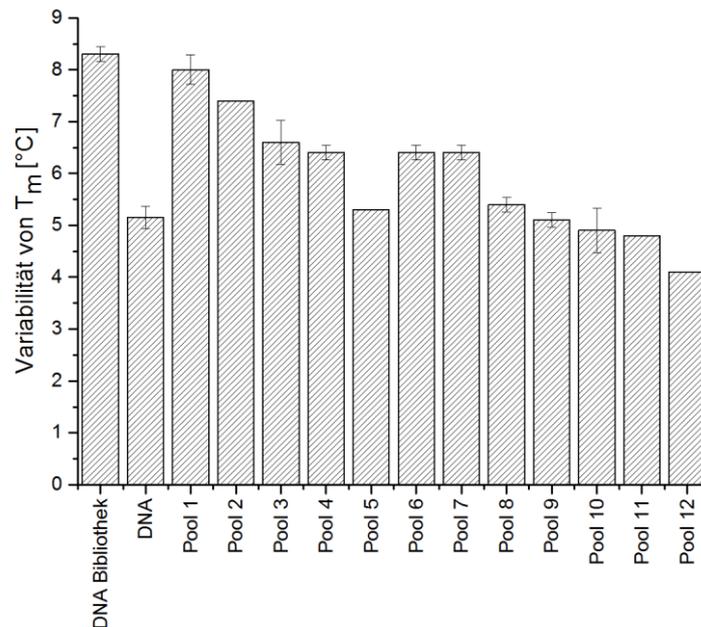


Abb. 49: Diversitätsassay zur Überwachung der N-SELEX-Entwicklung. Die Breite des Schmelztemperaturpeaks wurde für die DNA-Bibliothek berechnet; Negativkontrolle (DNA), z. B. eine DNA mit der gleichen Länge wie die DNA-Pools (Pool 1- Pool 12) aus entsprechenden SELEX-Runden. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD ($n=2$).

Die DNA-Moleküle aus der letzten N-SELEX-Runde wurden nach der Sanger-Methode sequenziert. Dabei wurden 32 Oligonukleotide identifiziert (Tab. 69). Der Consensus dieser Sequenzen besaß eine Länge von 22 Nukleotiden (Abb. 87, CCCTCTCCCCGCTCTCTCTCCC). Drei der Sequenzen traten wiederholt auf (Abb. 87; Tab. 69; 17_N_11 und _25 sowie _17 und _21). Dabei zeigte ein DNA-Molekül eine abweichende Länge (Tab. 78; 56 nt statt 40 nt) des randomisierten Bereiches.

E170_N_10 und _20 wiesen an zwei Positionen Unterschiede auf. Bei E170_N_4 und _30 betrug der Unterschied nur eine Base. Die freie Enthalpie für die 2D-Strukturen der Oligonukleotide lag zwischen -3.7 und -10.3 (kcal/mol) bei RT und zwischen -0.7 und -9.0 (kcal/mol) bei 37 °C.

ERGEBNISSE

Acht der Oligonukleotide (24%) waren in der Lage, G-Tetraden auszubilden. Dabei konnten sich bei dem Oligonukleotid E170_N_7 zwei GQs mit der gleichen Wahrscheinlichkeit (Score von 18) formieren. Die drei Motive der Oligonukleotide aus der letzten N-SELEX Runde sind in Abb. 50 dargestellt. Dabei ist das erste Motiv sehr CT-reich und weist eine Länge von 29 Nukleotiden auf, deren Sequenzen sich vor allem in den ersten fünf Positionen unterscheiden. Auch in dem zweiten Motiv sind neben vielen Guanosinen variable Nukleotide zu beobachten. Das dritte Motiv mit der Länge von 13 Nukleobasen ist konserviert und kommt bei drei der Oligonukleotide vor Tab. 49 (E170_N_11; _22 und _25).

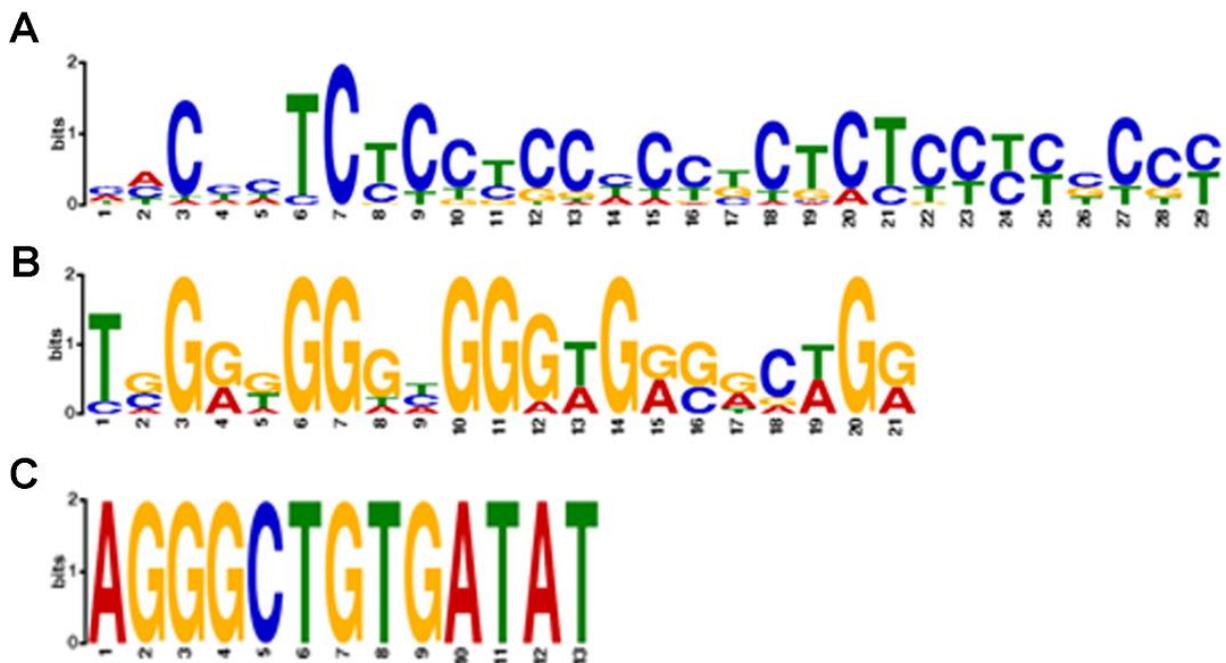


Abb. 50: Gemeinsame Sequenzmotive der selektierten DNA-Moleküle nach der N-SELEX für Embp170. Panel A: Motiv 1_MEME_E170_N; Panel B: Motiv 2_MEME_E170_N; Panel C: Motiv 3_MEME_E170_N.¹⁶³ Die X-Achse zeigt die Nummer des Nukleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

Sechs Nukleotide beinhalten zwei der gefundenen Motive (E170_N_11; _14; _16; _18; _22; _25).

ERGEBNISSE

Tab. 49: Struktur motive der DNA-Moleküle. Die Analyse erfolgte mittels MEME *Suite*.

Motiv	Strang	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_E170_N	+	1; 2; 3; 4; 7; 8; 9; 10; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 20; 31; 23; 24; 26; 27; 29; 32
Motiv 2_MEME_E170_N	+	11; 22; 25; 31
	-	6; 14; 16; 18
Motiv 3_MEME_E170_N	+	11; 22; 25

+ Die Motivstelle wurde in der dargestellten Reihenfolge gefunden. - Die Motivstelle lag in revers-komplementärer Ausrichtung vor.

Eine der Sequenzen wurde sowohl bei der N- als auch bei der C-SELEX (11N, 23C und 26N) gefunden. Die sich dabei wiederholende Sequenz zeigte bei den Molekülen aus der N-SELEX die höchste Stabilität (-10.7 kcal/mol bei 25 °C und -7.1 kcal/mol bei 37 °C). Außerdem waren die Moleküle in der Lage GQs auszubilden.

Tab. 50: Sequenzwiederholung nach der Sanger-Sequenzierung. Zusammenfassung aus den SELEXes für das Embp-Molekül.

Sequenz 5'→3'	DNA
TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT	170_: N_11; N_26 und C_23

5.6 Next Generation Sequencing (NGS)

NGS ermöglicht es, eine große Anzahl von Nukleinsäure-Molekülen in kürzester Zeit zu sequenzieren. Für diese Methode wurden fünf SELEX-Pools (CD24-SELEX, CD54-SELEX, Embp125-SELEX und die beiden Embp170-SELEXes) anhand des Diversitätsassays (Abb. 24; Abb. 82; Abb. 84; Abb. 47; Abb. 48 und Abb. 49;) ausgesucht. Neben den ersten und letzten Selektionspools wurden solche gewählt, bei denen die DNA-Moleküle die homogensten Schmelztemperaturen aufwiesen. Um die NGS-Pools (DNA-Pools zur Vorbereitung des NGS Experimentes) zu erzeugen (Abb. 18), wurden die DNA-Moleküle (76 bp) in einer ersten PCR (Tab. 29; Programm Tab. 30) um die NGS-Adaptersequenzen (123 bp) verlängert. Der Erfolg des Experimentes wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

ERGEBNISSE

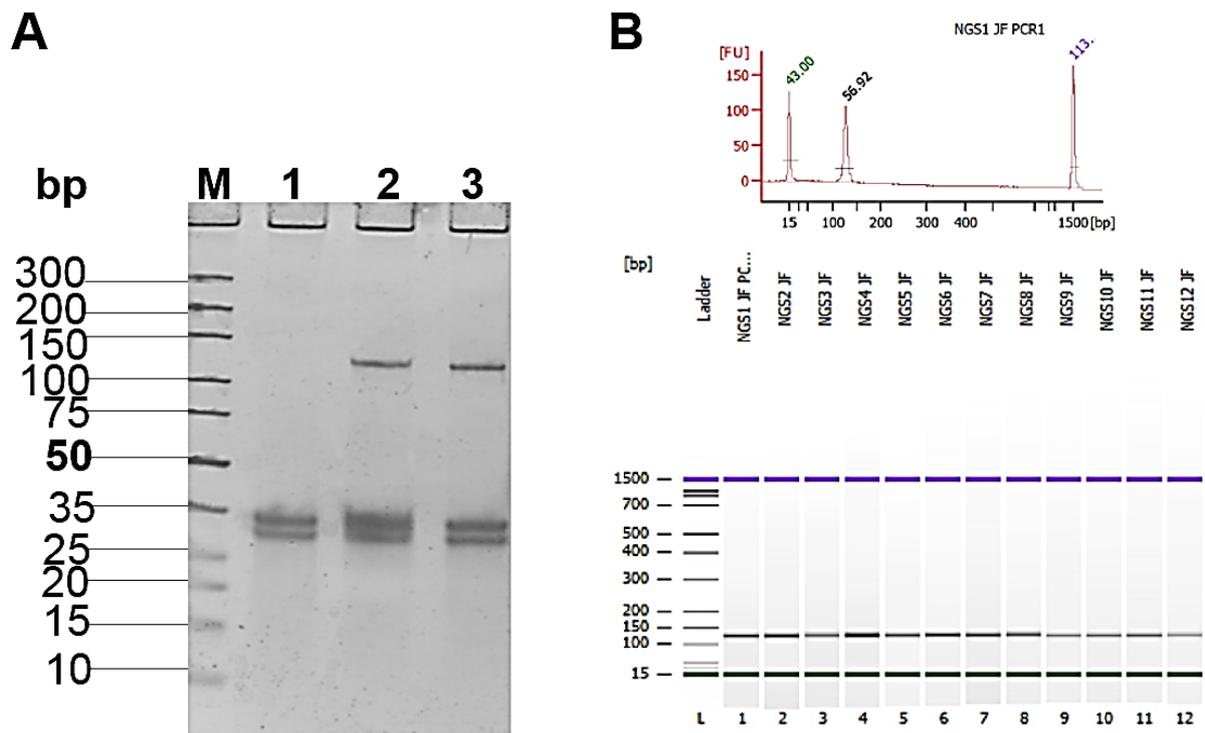


Abb. 51: Überprüfung der Adapter-PCR. Es wurden (je 6 pg) 12-16 PCR-Zyklen durchgeführt. Panel A: 10%ige, native PAGE zur Kontrolle der PCR. M: *O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*; NK: Negativkontrolle; 1-3: Amplifikationsprodukte (123 bp) von drei Selektionspools. Primerbanden sind ebenfalls erkennbar (39 und 44 nt). Panel B: Bioanalyzer-Messungen der gereinigten PCR-Produkte. Oben ist für eine der Proben ein Elektropherogramm zu sehen, unten das Ergebnis der Elektrophorese von 12 PCR-Produkten. Die Produktbanden (123 bp) sind schwarz dargestellt. Die beiden internen Kontrollen sind grün (15 bp; 4.20 ng/μL) und violett (1500 bp; 2.10 ng/μL) markiert. In der linken Spur (*Ladder*) ist der Marker (15-1500 bp) aufgetragen.

Neben den Produkten mit der erwarteten Größe von 123 bp wurden auch zwei Banden der im Überschuss dazugegebenen Primer detektiert (Abb. 51; Panel A). Nach der Gelreinigung wurden die Produkte auf einem Bioanalyzer untersucht (Abb. 51; Panel B). Hier wurden die gewünschten Produkte ebenfalls nachgewiesen. Da die 20 DNA-Pools zusammen sequenziert werden sollten, wurden sie mit individuellen Indizes versehen. Dazu wurde eine zweite Amplifikation durchgeführt. Die PCR-Produktbildung wurde auch hier mittels nativer PAGE nachgewiesen (Abb. 52; Panel A). Neben dem erwarteten Produkt von 188 bp zeigten sich auch die Banden der beiden Primer (44 und 63 nt). Nach der Reinigung wurden die NGS-Pools einer Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer unterzogen (Abb. 52; Panel B). Auch hier wurde das reine Produkt mit der gewünschten Größe von 188 bp gefunden.

ERGEBNISSE

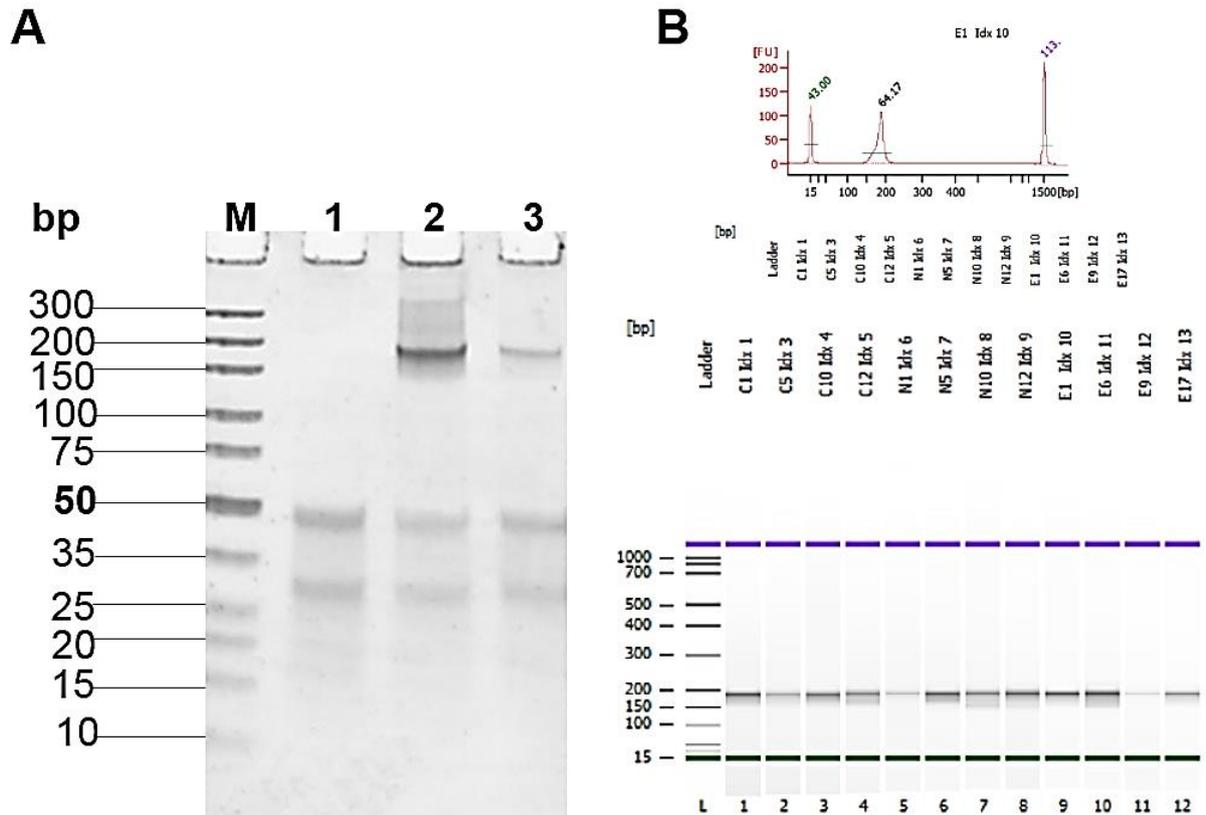


Abb. 52: Überprüfung der Index-PCR. Es wurden 16-20 PCR Zyklen durchgeführt. Panel A: 10%ige, native PAGE zur Kontrolle der PCR. M: *O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*; NK: Negativkontrolle; 1-2: die 188 bp langen Amplifikationsprodukte von zwei Selektionspools. Die Primerbanden sind in allen drei Probenspuren (1-3) erkennbar (44 und 63 nt). Panel B: Analyse gereinigter PCR-Produkte mittels Bioanalyzer. Oben ist das Elektropherogramm einer Probe zu sehen und unten das Ergebnis der Elektrophorese von 12 PCR-Produkten. Die Produktbanden sind schwarz dargestellt. Die beiden internen Kontrollen sind grün (15 bp; 4.20 ng/μL) und violett (1500 bp; 2.10 ng/μL) markiert. Die linke Spur (*Ladder*) ist die Markerspur (15-1500 bp).

Die quantitative Bestimmung mittels Qubit zeigte, dass die DNA-Pools in ausreichenden Konzentrationen für das NGS-Experiment vorlagen. Die Konzentrationen der DNA-Bibliotheken (jeweils 8 μL) lagen zwischen 1.2-7.9 ng/μL. Für das NGS wurden insgesamt 3 ng benötigt. Die Daten wurden mittels eines HiSeq2000-Gerätes (Braunschweig, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) generiert und wie in 4.2.7.2 beschrieben ausgewertet. Dabei wurde in beide Richtungen sequenziert (50 *pair ends*). Während 50 bp lang von einem Ende (in Richtung 5'→3') die Sequenz (R1) entschlüsselt wurde, passierte das gleiche am anderen Ende (in Richtung 5'→3', R2).

ERGEBNISSE



Abb. 53: Pair end Sequenzierung. Hier werden je 50 bp aus beiden Richtungen sequenziert (R1 und R2). Die Generierung der 76 nt langen DNA-Moleküle erfolgte über die überlappenden Bereiche (schematisch durch Linien verbunden). Die Primerregionen wurden hervorgehoben.

Durch diese zwei überlappenden, paarweisen Lesevorgänge von je 50 bp sollten die Sequenzinformationen von den Aptamerkandidaten mit einer jeweiligen Länge von 76 nt erhalten werden. Insgesamt wurden von 12 DNA-Pools 2685 Sequenzen generiert. Die Ergebnisse der NGS-Analyse sind in Tab. 51 dargestellt.

Tab. 51: Übersicht der NGS-Ausbeute. Die Sequenzdaten wurden anhand der jeweiligen Indizes dem entsprechenden SELEX-Pool zugeordnet.

SELEX	Barcode 5→3	Index	Anzahl der DNA-Sequenzen
C1	CGTGAT	1	275
C5	GCCTAA	3	197
C10	TGGTCA	4	171
C12	CACTGT	5	292
N1	ATTGGC	6	176
N5	GATCTG	7	171
N10	TCAAGT	8	179
N12	CTGATC	9	242
E1	AAGCTA	10	183
E6	GTAGCC	11	373
E9	TACAAG	12	0
E17	TTGACT	13	0
CD24_R1	GGAAct	14	0
CD24_R4	TGACAT	15	204
CD24_R10	GGACGG	16	222
CD24_R12	CTCTAC	17	0
CD54_R1	GCGGAC	18	0
CD54_R4	TTTCAC	19	0
CD54_R10	GGCCAC	20	0
CD54_R12	CGAAAC	21	0

ERGEBNISSE

Analyse der mittels NGS ermittelten Sequenzen

Für alle vier Runden wurden Sequenzdaten (Tab. 51; 1, 5, 10 und 12) mittels NGS generiert. Die Daten wurden auf die randomisierten Bereiche (40 nt) beschränkt. Diese wurden mit Hilfe der Web-Applikation *Multalin* und *ClustalOmega* miteinander verglichen.^{161,167} Innerhalb dieses Nukleinsäure-Pools nach der C-SELEX-Methode für das Embp als Target kamen 29 DNA-Moleküle wiederholt vor. Die Moleküle aus der ersten SELEX-Runde wiesen eine Base (G) in der Consensus-Sequenz auf, nach der fünften Runde kamen bei allen Oligonukleotiden zwei konstante Basen (TC) vor. Nach Runde zehn wies der Consensus acht Basen (CCCCCTCC) auf und 52 DNA-Moleküle wurden mehrfach in dem Pool gefunden. Nach Runde 12 konnte keine Base in der Consensus-Sequenz gefunden werden. Der Vergleich aller mit NGS generierten Sequenzpools zeigte keine Consensus-Sequenz an. Dabei kamen 41 der DNA-Moleküle wiederholt vor. Allerdings handelte es sich bei diesen Sequenzen um Daten aus der fünften und zehnten Runde (Abb. 89). Im Weiteren wurden die NGS-Sequenzdaten mit denen nach der Sequenzierung mittels Sanger-Methode miteinander verglichen. Dabei zeigte es sich, dass die Sequenzen der DNA-Moleküle nach Runde fünf denen aus der Sanger-Sequenzierung ähnlicher waren (Abb. 88) als zu den restlichen Pools. Nach Runde fünf wurden fünf (3%) der Sequenzen nach beiden Sequenzierungs-Methoden gefunden (E170_C_3; _6; _7; _24 und _28). In Runde eins konnte keine Consensus-Sequenz gefunden werden, während bei Runde fünf zwei Basen in der Consensus-Sequenz (C und T) auftraten. Nach Runde zehn wurden sieben (4%) der nach Sanger-Methode identifizierten Sequenzen auch in den NGS-Pools gefunden (E170_C_3; _6; _7; _22; _23; _24 und _28). Der Anstieg im Verwandtschaftsgrad der DNA-Moleküle mit zunehmenden SELEX-Runden, lässt auf eine erfolgreiche Anreicherung des DNA-Pools schließen. In Runde zehn erschienen sieben Nukleinbasen in der Consensus-Sequenz, was im Vergleich zur Runde fünf eine 3.5fache Erhöhung bedeutet. Nach der 12ten Runde zeigte sich keine Consensus-Sequenz beim Vergleich der beiden Sequenzierungsmethoden. In den 292 Sequenzen, die mittels NGS für DNA-Pools für Embp125 als Zielsequenz generiert wurden, kamen keine Sequenzen wiederholt vor.

ERGEBNISSE

N-SELEX

Für alle vier Runden (Tab. 51; 1, 5, 10 und 12) konnten Sequenzdaten mittels NGS generiert werden. Insgesamt waren das 769 Sequenzen. Die Daten wurden wie oben beschrieben prozessiert (Empb NGS-Analyse; C-SELEX). Die Analyse des NGS-Pools nach der ersten Runde zeigte nur eine Base (C) in der Consensus-Sequenz. Nach Runde fünf waren vier Cytosine im Consensus eingeordnet. Die DNA-Moleküle nach Runde zehn bildeten eine Consensus-Sequenz aus sieben Basen (TCCCTCC). Nach Runde 12 wiesen die Sequenzen der DNA-Moleküle eine höhere Heterogenität auf als innerhalb der früheren Runden. Bei 34 DNA-Molekülen kam die wiederholte Sequenz in mindestens zwei der Pools vor (Runde 1, 5 bzw. 10). Dabei wurden neun Sequenzen nach Runde eins, 54 nach Runde fünf und 43 Sequenzen nach Runde zehn gefunden (Abb. 88). Eine Sequenz trat 16 Mal (R1/R5/R10), zwei traten zweimal (R5/R10) und zwei dreimal (R1/R5/R10) auf, sowie zwei Sequenzen viermal (R5/R10) (Abb. 90). Die Daten wurden auch mit den Sequenzen, die mittels der Methode nach Sanger generiert wurden, verglichen. Eine DNA-Sequenz (E170_N_4) wurde bereits in der ersten Runde gefunden. In Pool 5 wurden sechs Sequenzen nach der Sanger-Sequenzierungsmethode identifiziert (E170_N_2; _4; _10; _11; _17_21 und _25). Diese wurden wiederholt vorgefunden. Nach Runde zehn wurden neun Sequenzen aus dem Sanger-Pool gefunden: E170_N_3; _4; _7; _11; _14; _16; _17; _21; _25. Dabei lagen vier in mehreren Kopien vor. Nach der 12ten Runde zeigten sich auch hier keine identischen DNA-Moleküle zwischen den Sequenzdaten, die mit Hilfe der beiden Sequenzierungs-Methoden erhalten wurden, obwohl hier mit 242 Sequenzen die meisten Daten erzeugt wurden.

Vergleich zwischen N- und C-SELEX in den NGS-Pools

In den 1703 DNA-Molekülen die nach beiden SELEX-Methoden selektiert wurden, fanden sich nur wenige Moleküle in beiden DNA-Pools (Abb. 54). In Runde fünf wurde eine Sequenz bei vier der selektierten DNA-Moleküle gefunden (3 x C-SELEX und 1 x N-SELEX), in Runde zehn kam eine Sequenz 8-mal (5 x N-SELEX und 3 x C-SELEX) vor.

ERGEBNISSE

```

C_R10_rev_16      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
C_R10_rev_41      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
C_R10_rev_76      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
N_R10_rev_88      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
N_R10_rev_69      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
N_R10_rev_60      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
N_R10_rev_57      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
N_R10_rev_19      TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGT--CAGGG--CTGTGATAT---
C_R5_rev_33       -----GCCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
C_R5_rev_66       -----GCCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
C_R5_rev_85       -----GCCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
N_R5_rev_54       -----GCCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
                    *  **  *  *  *      *  *  *  *  *  *

```

Abb. 54: Anreicherung von DNA-Molekülen in den beiden SELEX-Ansätzen für das Embp170-Target. Unabhängig von der Selektionsart kam es in beiden Pools zu einer Anreicherung von DNA-Molekülen, die eine der oben dargestellten Nukleotidabfolgen aufwiesen. Die Basen der Consensus-Sequenz sind mit Sternen markiert.

E-SELEX-Pool NGS-Analyse

In den nach NGS erhaltenen Sequenzen konnte kein Consensus erstellt werden (Abb. 85).¹⁶¹ Die sechs Oligonukleotide, die bei beiden Sequenzierungsmethoden auftraten, sind in Tab. 52 dargestellt.

Tab. 52: DNA-Moleküle die mittels Sanger-Methode und NGS identifiziert wurden und die gleiche Sequenz besaßen.

17te Runde (Sanger)	6te Runde (NGS)
161 und 173	rev_136
171 und 177	rev_1; 25 und 137
69 und 176	rev_43 und 88

Sequenzen aus Runde eins ergaben keinen Consensus. Pool 6 verfügte im Gegensatz zu Pool 1 über Sequenzwiederholungen (Abb. 55).

ERGEBNISSE

```

1                                                                 43
E_R6_rev_1      TGTGGGTG GGTGGGTGGC GCTGAAGTCA GGGCTGTGAT AT
E_R6_rev_2      TGTGGGTG GGTGGGTGGC GCTGAAGTCA GGGCTGTGAT AT
E_R6_rev_1      TGTGGGTG GGTGGGTGGC GCTGAAGTCA GGGCTGTGAT AT
E_R6_rev_4      CATGGGGTGT GGTGGGTGGA AGTGTAAAGT CACTTGTGGA
E_R6_rev_1      CATGGGGTGT GGTGGGTGGA AGTGTAAAGT CACTTGTGGA
E_R6_rev_6      CATGGGGTGT GGTGGGTGGA AGTGTAAAGT CACTTGTGGA
E_R6_rev_7      TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGGGT CAGCCTTGCT
E_R6_rev_1      TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGGGT CAGCCTTGCT
E_R6_rev_1      TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGAGT CAGCCTTGCT
E_R6_rev_1      TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGAGT CAGCCTTGCT
E_R6_rev_2      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_5      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_7      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_7      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_8      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_1      TTTATGAC AATGGCCAAC TGTACGGTGG GAGGGCGGGT GG
E_R6_rev_4      CGCGGTAC ATTTGA-AGC GATCGTGAAT GCGGGTGGT GGG
E_R6_rev_8      CGCGGTAC ATTTGA-AGC GATCGTGAAT GCGGGTGGT GGG
Consensus      ..tg.gggac a.TgG..agc gaT..tga.t g.gggtgGgt gg.
```

Abb. 55: Sequenzwiederholungen nach Runde 6 der Embp125-SELEX im NGS-Pool. Hierbei wiederholten sich fünf Sequenzen in insgesamt 18 DNA-Molekülen.

CD24 NGS-Daten

Es folgte die Analyse der Sequenz-Daten, die mit Hilfe der NGS-Methode für DNA-Pools nach der SELEX für das CD24-Protein generiert wurden. Für die Runden 4 und 10 wurden Sequenzdaten mittels NGS (Tab. 51) generiert, welche untereinander eine Verwandtschaft aufwiesen. Dabei waren Sequenzen, die nach der letzten SELEX-Runde nach der Sanger-Methode gefunden wurden, auch in den NGS-Pools 10 und 5 vorhanden. Auch die Aptamere CD24A_2 (R4_rev_52) und CD24A_60 (R10_rev_76) wurden bereits in früheren Runden gefunden (R4 und R10). In Übereinstimmung mit der Sanger-Sequenzierungs-Methode zeigte die NGS-Analyse, dass die randomisierten Bereiche reich an Adenosinen waren. (Abb. 77). Dies bestätigt somit, dass bestimmte Moleküle nicht durch eine der Methoden bevorzugt werden. Der Verwandtschaftsgrad stieg von 12.5% bei den Molekülen aus Runde 4 auf 33% nach Runde 10. Der Verwandtschaftsgrad der Moleküle aus den drei Pools (NGS R4 und R10 und Sanger R12) lag bei 30%. Unter den 426 DNA-Molekülen aus den beiden NGS-Pools fanden sich keine identischen Sequenzen.

ERGEBNISSE

5.6.1 DNA-Moleküle die in verschiedenen Runden wiederholt auftraten

Die NGS-Daten wurden zusätzlich mit der Software von Frau Laura Lledó Bryant verglichen, welche im Rahmen ihrer Doktorarbeit an der Universität Bonn entwickelt wurde (Arbeit noch nicht publiziert). Mit Hilfe dieser Software werden solche Moleküle identifiziert, die sowohl innerhalb einer Runde als auch zwischen den verschiedenen Selektions-Runden auftreten. Bei der N-SELEX wurden 12 und bei der C-SELEX acht Sequenzen wiederholt innerhalb der untersuchten Runden gefunden (Pool 1, Pool 5, Pool 10 und Pool 12). Die sich wiederholenden Sequenzen aus der SELEX für das Protein Embp170 sind unten dargestellt (Abb. 56, Abb. 58).

```

1                                                                                               49
C_M_NGS_1      CCCCAT CCTCGCTCTC TCGCT-TCTC GA-TGCTCTC TCGCCT
C_M_NGS_2      CGCTC TCTGACCCC- CCTCACTCCC TC-CACGCTC CCGGCCC
C_M_NGS_8              TC TCTGACCCCA CCGCTCTTCC TC-ACCTCCC TCCCTCCGT
C_M_NGS_3      GCCTG TCTTCCCT- CCGCTCTCTC GCTCCCTCGC TCCCCC
C_M_NGS_6      GCCTG TCTTCCCT- CCGCTCTCTC GCTCCCTCGC TCCCCC
C_M_NGS_4      GCCTG TCTTCCCTC- CCGCTCTCTC GCTCCCTCGC TCCCCC
C_M_NGS_5      GCCTG TCTTCCCT- CCGCTCTCTC GCTCCCTCAC TCCCCC
C_M_NGS_7      GTGCCGGCTC CCTTCCCCGA CTCCTCTCTC ---AACTCCC TCC
Consensus      .....ctc tCTc.Ccc.. ccgCtcTctc .c...CtC.C tCcccc...

```

Abb. 56: Wiederholt vorkommende DNA-Moleküle aus der C-SELEX. Dargestellt sind 40 nt aus randomisierten Bereichen. Die Sequenznamen sind wie folgt gewählt: C: C-SELEX, M: mehrfach gefunden; NGS: Sequenzierungsmethode. Die Farben korrespondieren mit dem Konservierungsgrad (rot: keine Sequenzvariabilität und blau: geringe Basenvariabilität).

Die acht identifizierten Moleküle wiesen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (Abb. 56). Jeweils zwei identische Moleküle traten sowohl bei den Sequenzdaten, die nach der Sanger-Methode generiert wurden (12te Runde) als auch bei der NGS-Analyse auf (Tab. 53).

Tab. 53: Sequenzen der identischen DNA-Moleküle. Die DNA-Moleküle, die sowohl nach der Sequenzierung nach der Sanger-Methode (24_ bzw. 3_Sanger) als auch mit NGS (3_ bzw. 6_NGS) gefunden wurden.

Sequenz 5'→3'	DNA-Molekül
GCCTGTCTCTCC <u>C</u> TCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC	3_NGS 24_Sanger
GCCTGTCTCTCC <u>T</u> TCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC	6_NGS 3_Sanger

ERGEBNISSE

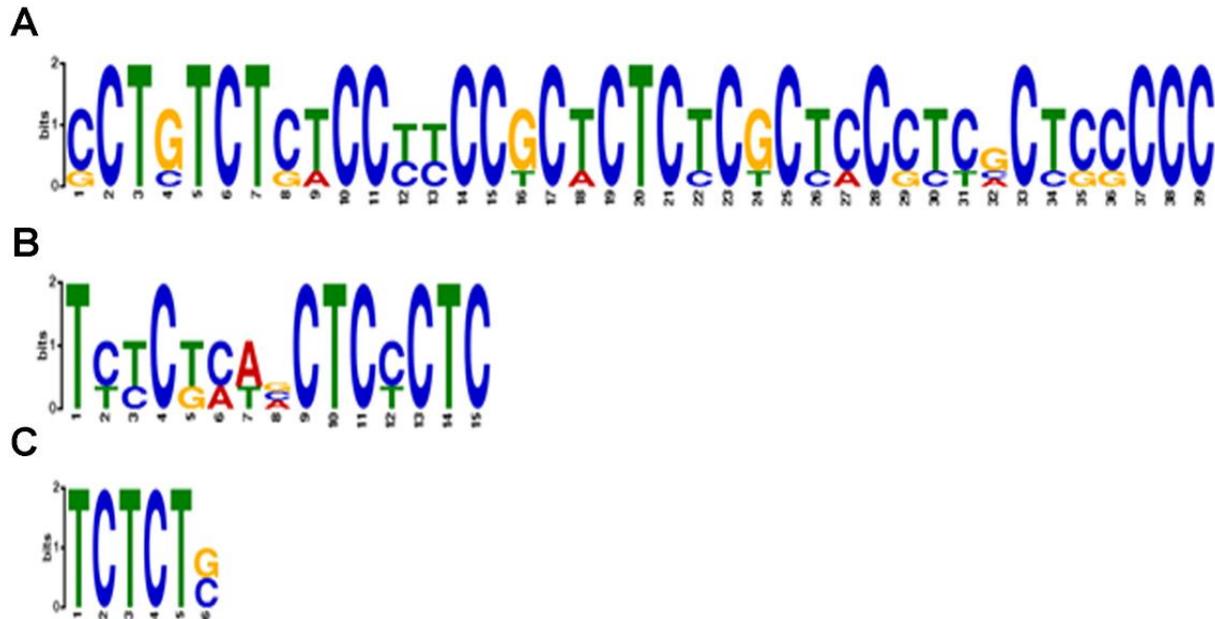


Abb. 57: Die Darstellung der Sequenzmotive der in Runde 5 und in Runde 10 wiederkehrenden DNA-Moleküle.¹⁶³ Die X-Achse zeigt die Nummer des Nucleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

Tab. 54: Strukturmotive der acht DNA-Sequenzen, die in den unterschiedlichen Runden wiederkehrend gefunden wurden. Die Analyse der Motive erfolgte mittels MEME *Suite*.¹⁶³

Motiv	Strang (Anzahl)	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_C_M_NGS	+ (5)	2; 3; 4; 5; 6
Motiv 2_MEME_C_M_NGS	+ (3)	1; 7; 8
Motiv 3_MEME_C_M_NGS	+ (2)	1; 8

N-SELEX

Bei den vier untersuchten NGS-Pools kamen 12 Moleküle während der N-SELEX wiederholt vor (Abb. 58).

ERGEBNISSE

```

1                                                                                               46
N_M_NGS_1    C C C C A A T G  G C G A C T C C T C  C C G C T C --- C  C C T C C C T C T C  T G C A C
N_M_NGS_5    T C C C C A C C G  A C C T C T C T C T  C A G C T C --- C  C T T C T C T C C C  T G C C
N_M_NGS_6    T C C C C A C C G  A C C T C T C T C T  C A G C T C --- C  T T T C T C T C C C  T G C C
N_M_NGS_7    T C C T C C C T C  T C C T G T C T C C  C T C C T C G C A G  C T T C C C C C C C
N_M_NGS_11   C A C A C C T A  T C C T G T C T C C  C C T C T C - C G C  C C T C T C T C C C  T G A
N_M_NGS_12   T C C C T C  G C C C C T C T C C  T T C C T C -- T C  C C T C G T C T C T  T G G T C A
N_M_NGS_8    T C C T C T C - C  T C T C C A C T C C  G A T C C C T G C C  C C T C T C G C T A  T C
N_M_NGS_2    G A C T A A T C C C  T C T C C T C C C C  C G - C T C T - C C  - C T C - C C C G A  T C C C
N_M_NGS_4    T C C A A T A C C  C T A C C T C T A C  C T - C C C T - C C  - C T C - T C C T C  T G C C
N_M_NGS_3    T A C C T C C G  C T C T C T C C C C  C T - C T C T - G C  T C C C T T C T C C  T G T A
N_M_NGS_10   T T A G C A C A A  T C T C C T C C T C  C T - C T C T - C C  T C T C G T C C C C  T C C C
N_M_NGS_9    T G T G  G G T G G G T G G G  T G G C G C T G A A  G T C A G G G C T G  T G A T A T
Consensus    . c . . c . c . .  . c . . c t c t c c  c . . C t C t . . c  . c t c . . c c c c  T g . . . .

```

Abb. 58: Wiederholt auftretende DNA-Moleküle. Dargestellt sind randomisierte Bereiche (40 nt) der 12 Nukleotidabfolgen. Die Daten stammen aus der N-SELEX für das Embp170 Molekül. Die Namen der Sequenzen sind wie folgt gewählt: N: N-SELEX, M: mehrfach gefunden; NGS: Sequenzierungsmethode. Die Farben korrespondieren mit dem Konservierungsgrad (rot: keine Sequenzvariabilität und blau: geringe Basenvariabilität).

Anders als bei der C-SELEX (Abb. 56) finden sich bei den Nukleotidsequenzen aus der N-SELEX (Abb. 58) drei hochkonservierte Basen. Eine Ähnlichkeit besteht in dem hohen TC-Gehalt der Consensus-Sequenzen (Abb. 58).

Tab. 55: Identische Sequenzen aus der N-SELEX. Die DNA-Moleküle aus der konventionellen Sequenzierung (4, 11, 17, 21 bzw. 25) wurden auch in NGS-Pools (8, 9 bzw. 10) gefunden.

Sequenz 5'→3'	DNA-Nummer
TTAGCACAATCTCCTCCTCCTCTCTCCTCTCGTCCCCTCCC	17_ und 21_Sanger 10_NGS
TCCCCACCGACCTCTCCCTCAGCTCCTTTCTCTCCCTGCC	4_Sanger 8_NGS
TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT	11N_ und 25N_Sanger 9_NGS

ERGEBNISSE

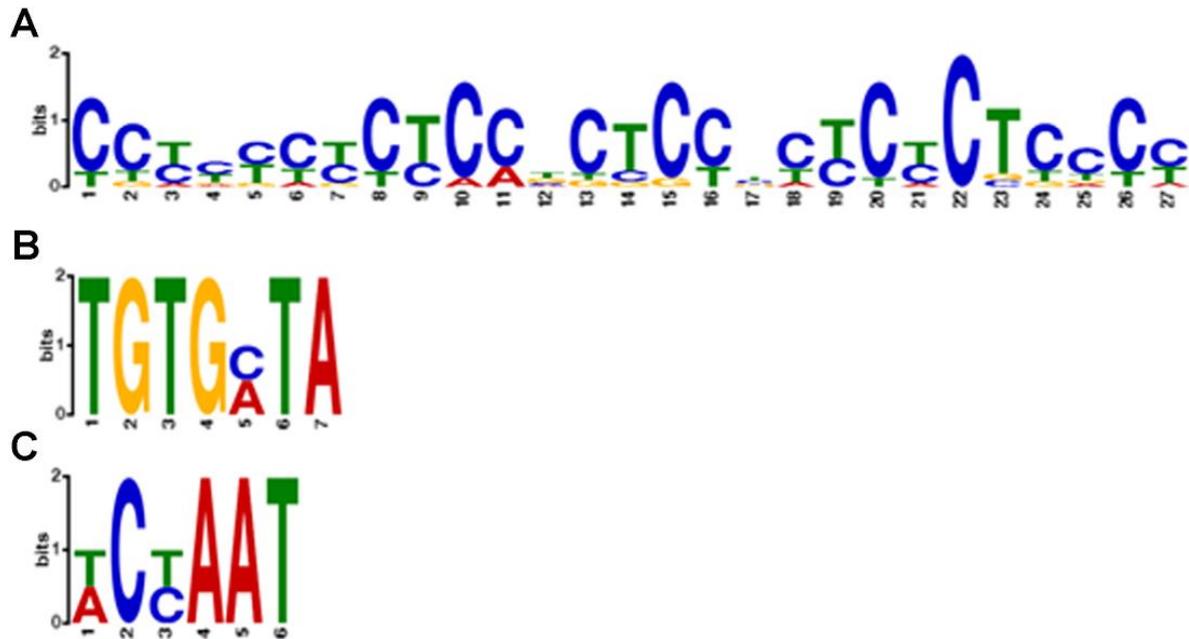


Abb. 59: Motive der sich in den Runden wiederholender und wiederkehrender DNA-Moleküle.¹⁶³ Die X-Achse zeigt die Nummer des Nukleotides und die Y-Achse über das Größenverhältnis der Buchstaben die Frequenz, mit der die Basen an einer bestimmten Position vorkommen.

Tab. 56: Sequenzmotive der 12 DNA-Sequenzen, die in den unterschiedlichen Runden wiederkehrend gefunden wurden. Die Analyse der Motive erfolgte mittels MEME Suite.¹⁶³

Motiv	Strang (Anzahl)	Nukleinsäuren
Motiv 1_MEME_N_M_NGS	+ (11) - (1)	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 11; 12 9
Motiv 2_MEME_N_M_NGS	+ (1) - (1)	10 9
Motiv 3_MEME_N_M_NGS	+ (2)	2; 4

6 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurden diverse SELEX-Methoden vorgestellt, um affine Nukleinsäuren (Aptamere) für drei medizinisch relevanten Proteine (Embp, CD24 und CD54) zu selektieren. Bei den Zielmolekülen handelte es sich um zwei Oberflächenmembranproteine eukaryotischer Zellen und um zwei Fragmente des Embp-Moleküls, welches von der Oberfläche des Bakteriums *S. epidermidis* stammt.^{64,107,152}

CD24 kann als eine Molekülgruppe definiert werden, da sein Glykosylierungsmuster nicht nur zwischen sondern auch innerhalb eines Zelltyps variiert.⁶⁸ CD24 wird unter anderem in einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen aber auch auf Endothel- und auf Nervenzellen nachgewiesen.^{64,68,73} Dabei steigt die Produktion des Moleküls auf das bis zu 5.4fache bei Tumorzellen im Vergleich zu Zellen aus gesundem Gewebe.⁷⁹ Diese Tendenz gilt auch für die sieben Tumorarten (Gehirn-, Brust-, Dickdarm-, Leber-, Lungen-, Eierstock- und Prostatakarzinom) mit der höchsten Sterberate weltweit.^{82,83,88–92} Auch bei autoimmunologischen und neurologischen Krankheiten spielt die erhöhte Produktion des CD24-Moleküls eine Rolle.^{75,76} Allerdings fehlen hier immer noch Studien, um die Interaktionen dieses Oberflächenproteins und die damit verbundenen Reaktionsmechanismen genauer verstehen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass gezieltes CD24-Targeting einen positiven Einfluss auf die Krebswachstumshemmung hat.⁹⁸ Allerdings sind solche Behandlungen mit den bekannten Risiken einer Antikörpertherapie verbunden.^{99,168,169} Hierzu könnten Aptamere nicht nur als stabilere und weniger immunogene Alternative fungieren, sondern auch aufgrund ihrer kleineren Massen (3.37-31.0 kDa) leichter in die Tumore eindringen. Die Nukleinsäuren, die das CD24 binden können, können zusätzlich zu Detektionszwecken und zur Feststellung der Krankheitsprognose angewendet werden. Die CD24-Aptamere könnten z. B. dazu benutzt werden, Krebsstammzellen (CSC: *cancer stem cells*) aus Tumorgewebe mit der FACS-Technologie anzureichern, um diese höchst aggressiven Tumorzelltypen anschließend weiter analysieren zu können.^{170–173}

Bei dem zweiten CD-Molekül (CD54), welches besser als ICAM-1 bekannt ist, handelt es sich um ein Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie. ICAM-1 wird

DISKUSSION

normalerweise nur in geringeren Mengen von Endothelzellen und Zellen des Immunsystems produziert.¹⁰⁷ Erst infolge einer Entzündungsreaktion wird das Level an CD54 erhöht. Sukzessive kann dieses Molekül effizienter die Leukozyten binden und diese in dem Extravasationsprozess aus der Blutbahn an den Entzündungsort befördern.¹¹¹

Alle Indizien sprechen bislang dafür, dass die CD-Moleküle eine wichtige Rolle bei Metastasierungsprozessen spielen. Aptamere für diese Targetmoleküle haben damit das Potenzial, die Krebsverbreitung auf molekularem Level zu unterbinden. Dabei ist entscheidend, dass diese Oligonukleotide die Interaktionen zwischen den Targetmolekülen und ihren Bindungspartnern beeinflussen können.

Für die Selektion von Aptameren, die Targets in deren nativer Form erkennen können, wird die Zell-SELEX-Methode angewendet. Bei den Zell-SELEX-Experimenten, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden entweder die HT-29- oder die HCT116-Zellen als Targetträger verwendet. Aus diesen parental Zellen hergestellte *Knockdown*-Zelllinien wurden für die negative SELEX verwendet. Die beiden Targetzelllinien stammen ursprünglich aus Dickdarntumoren. Das Kolonkarzinom stellt weltweit die dritthäufigste krebisbedingte Todesursache dar (Abb. 12).

Die HCT116-Zellen besitzen eine geringe oder fehlende Differenzierungsfähigkeit, was auch mit ihrer niedrigen CD24-Produktion zusammenhängen kann (Abb. 63). Im Vergleich dazu besitzt die HT-29-Zelllinie eine mittlere Fähigkeit zur Differenzierung in Enterozyten und Mucin produzierenden Abstammungslinien.^{174,175}

Aptamere, welche die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Krebszellen erkannten, könnten in der Forschung und der Diagnostik oder sogar therapeutisch eingesetzt werden. Auch die grundlegende Untersuchung der Eigenschaften dieser Krebszellen und der Targetproteine könnte mit Hilfe dieser Nukleinsäuren erfolgen. Diese Erkenntnisse könnten vor allem zur Identifizierung neuer Angriffspunkte für die Wirkstoffentwicklung führen.

Als drittes Molekül wurde das prokaryotische Embp-Protein ausgesucht. Hierzu wurden zwei Fragmente dieses 1 MDa großen Moleküls gewählt. Diese beiden Fragmente sind in der Lage an die humane FNIII-Domäne zu binden. Da bei den Wechselwirkungen zwischen *S. epidermidis* und unmodifizierten künstlichen Oberflächen (z. B. Katheter oder künstliche Herzklappen) keine spezifischen

DISKUSSION

Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auftreten können, konnte bewiesen werden, dass erst die Interaktion zwischen dem Targetprotein und der erwähnten Domäne des humanen Fibronektins, die spezifischen Wechselwirkungen vermittelt und zur Ausbildung von bakteriellen Biofilmen führen kann.¹³⁴ Diese Überlebensform des Bakteriums ist gegen alle bis jetzt angewendeten Reinigungsansätze (Vernichtungsansätze) resistent.^{152,176} Wenn dieser Keim durch kontaminierte Werkzeuge operativ eingeführt wird, kann dies zur Sepsis und sogar zum Tod führen. Deswegen werden Aptamere gesucht, um die Interaktion der beiden Proteine genauer zu untersuchen und diese zukünftig zu unterbinden. In den hier beschriebenen Experimenten wurden insgesamt sechs SELEX-Methoden angewendet, um für die vier Targets affine Nukleinsäuren zu finden. Hinsichtlich der späteren Anwendungen fiel die Wahl auf DNA-Aptamere. Diese sind nicht nur weniger reaktiv und stabiler als RNA-Aptamere, sondern zeigten bis jetzt auch eine niedrigere Immunogenität.^{28,177–179} Die Stabilität von Aptameren kann durch zusätzliche Strukturmerkmale, wie GQ, Haarnadelschleifen (*Hairpins*), innere Schleifen (*internal loops*) oder *bulge* Schleifen (*bulge loops*) weiter gesteigert werden.¹⁸⁰ Auch durch die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen können Nukleinsäuren vor Hydrolyse geschützt werden.¹⁸¹ Eine Derivatisierung kann gleichzeitig auch in einer Affinitätssteigerung zwischen der DNA und ihren Targets resultieren. Dadurch ist es möglich, Aptamere für Zielmoleküle zu finden, die mit natürlichen Nukleinsäuren schwer oder nur bedingt ansteuerbar sind. Zur Derivatisierung können Aptamere prä-selektiv z. B. in der *Click*-SELEX modifiziert werden oder auch post-selektiv beispielsweise mit der *Click*-Chemie verändert werden.^{47,182}

6.1 Selektion von Aptameren für das CD24-Molekül

Das relativ kleine CD24-Protein liegt eingebettet in sogenannten *lipid rafts*. Diese Regionen auf der äußeren Zellmembran sind reich an Sphingomyelinen, Glykosphingolipiden und Cholesterinen.⁶⁵ Aufgrund der negativen Ladung dieser Lipide ist es schwierig, die dort lokalisierten, negativ geladenen CD24-Moleküle mit Nukleinsäuren zu adressieren.

Für die Selektion der Aptamere für das CD24-Target wurden vier Methoden ausprobiert (Zell-SELEX, konventionelle SELEX, eine Fusion aus beiden Methoden

DISKUSSION

und *Click*-SELEX). Die abschließenden Bindungsstudien mit den unterschiedlichen Pools zeigten mit Ausnahme der Zell-SELEX bei 4 °C, dass keine Anreicherung affiner DNA-Moleküle erreicht werden konnte (Abb. 23 und Abb. 71 sowie Abb. 66 und Abb. 70).

Die Zell-SELEX bei der HCT116-Zellen als Targetträger benutzt wurden, zeigte eine starke Abnahme in der DNA-Pool-Konzentration, wenn eine negative SELEX im Anschluss an die Anreicherung von Targetbindern erfolgte. Dies wurde dadurch erkennbar, dass nach 33 PCR-Zyklen keine Produktbildung zu verzeichnen war. Der Misserfolg der Zell-SELEX mit HCT116-Zellen als Targetträgern kann auf eine zu niedrige Produktion des Zielmoleküls (Abb. 63) zurückzuführen sein. Deswegen wurde nach einer alternativen Zelllinie gesucht, bei der CD24 in höheren Mengen vorliegt. Hierzu wurden HT-29-Zellen ausgewählt. Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem ersten Experiment wurden in der zweiten SELEX mit den HT-29-Zellen umgesetzt. Zunächst sollte der DNA-Pool mit Target-bindenden Molekülen angereichert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst in den ersten neun Runden (R1-R9) eine konventionelle SELEX mit rekombinatem Target durchgeführt (12.1.1). Um zu verhindern, dass Binder für den IgG-Teil des verwendeten rekombinanten Fusionsproteins (Abb. 64) selektiert wurden, wurde außerdem eine negative SELEX mit *Bead*-immobilisiertem IgG-Protein (R7-R8) durchgeführt. Im zweiten Teil (R10-R15) dieses Selektionsversuches wurden die DNA-Pools mit einer komplexeren Aptamer-Matrix, den HT-29-Zellen, inkubiert. Obwohl in einem prä-SELEX Test (Dot-Blot: Abb. 65 und durchflusszytometrisch: Abb. 63) der CD24-Antikörper (ML-5) auf das Vorhandensein des gleiches Epitops sowohl auf dem rekombinanten CD24-IgG-Fusionsprotein als auch auf den Zellen hinwies, wurde während der SELEX eine Reduktion in der Konzentration des DNA-Pools beobachtet. Dies zeigte sich durch den Anstieg der benötigten PCR-Zyklusanzahl von 10+6 auf 12+8. Die Bindungstests mit den fluoreszenzmarkierten (Cy5 und FITC, 450 nM) DNA-Pools zeigten, dass kein Selektionserfolg gegenüber den HT-29-Zellen erreicht wurde. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass trotz des Vorhandenseins des ML-5 Antikörper-Epitops, die strukturellen Unterschiede zwischen dem rekombinanten und dem nativen Protein (HT-29-Zellen) zu groß für die Aptamerselektion waren. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Faltungsveränderungen infolge der

DISKUSSION

Immobilisierung an den SiMAG-*Beads* (4.3.6.1) kam. Dabei können theoretisch alle primären Amine des Proteins kovalent an die Carbodiimid-Gruppe gebunden werden. Deswegen wurde in einer weiteren SELEX eine andere Immobilisierungsmethode des Targets verwendet.

Bei der nächsten Selektion wurde nur das rekombinante Protein eingesetzt, um das SELEX-System möglichst konstant zu halten. Durch die Immobilisierung der Proteinmoleküle über den vorhandenen IgG-Teil (Abb. 64) wurde gewährleistet, dass diese nur einmal und über die gleiche Interaktionsstelle an die *Beads* gebunden wurden. Um das CD24-Target mit den Oligonukleotiden anzusteuern, wurde diesmal die *Click*-SELEX-Methode gewählt. Auf der Suche nach dem geeigneten Substituenten für diese Selektion, wurde die Wechselwirkung des CD24-Moleküls mit seinen Interaktionspartnern erforscht, wobei es jedoch widersprüchliche Ergebnisse gab. Da aber das CD24-Molekül mit vielen Zuckerresten versehen wird (bis zu 59% der AS), wurde nach Molekülen gesucht, die spezifisch Kohlenhydratstrukturen, wie Lektine, erkennen und binden können.

Dabei ist bekannt, dass die Kohlenwasserstoffe von Lektinen spezifisch durch nicht kovalente Bindungen wie H-Brücken und ionische sowie hydrophobe Wechselwirkungen erkannt werden.¹⁸³ Da die SELEX im neutralen pH-Bereich stattfindet, kann davon ausgegangen werden, dass die herrschenden Interaktionskräfte vor allem durch Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen. Für diese Interaktion wurden den Selektion-Pools daher entweder Guanidin- oder Indolreste zugefügt. Um zu vermeiden, dass eine post-selektive Fluoreszenzmarkierung die Affinität der selektierten Nucleinsäuren beeinflusst, wurde für die SELEX ein Cy5-modifizierter DNA-Pool verwendet.⁶¹ Allerdings blieb auch bei dieser Selektionsmethode der Erfolg aus. Ein möglicher Grund könnte sein, dass der Substitutionsgrad des randomisierten Bereiches mit 10% nicht optimal gewählt war. Womöglich wurden aber auch ungeeignete Substituenten ausgewählt. Vielleicht könnte ein Substituent aus einer anderen Molekülklasse, z. B. ein Zuckermolekül, hier zum Selektionserfolg führen. Einerseits, weil CD24 mit Zuckern interagieren kann und andererseits, weil das immobilisierte, rekombinante Protein in den prä-Selektionstests ein elektrophiles Verhalten zeigte, was durch erhöhte Affinität gegenüber dem alkylierten Pool zum Ausdruck (Abb. 68 und Abb. 69) kam. Nicht auszuschließen ist,

DISKUSSION

dass der Misserfolg der SELEX auch dem raschen und stringenten Selektionsdruck zuzuschreiben ist (Tab. 61 und Tab. 62). Deswegen könnte der Selektionsdruck der PCR-Zyklenzahl angepasst werden. Sobald die Anzahl an benötigten PCR-Zyklen über 15 steigt, wäre es empfehlenswert die betreffende SELEX-Runde unter weniger stringenten Bedingungen zu wiederholen. Da wiederholt in der Literatur berichtet wird, dass PCR-Artefakte (*molecular parasites*) den Selektionsprozess deutlich negativ beeinflussen können, wurde während der hier beschriebenen Arbeiten die Produktbildung stetig kontrolliert.^{184,157,185} Dabei zeigte sich, dass solche Artefakte sehr rasch entstehen und bereits ab zwei zusätzlichen PCR-Zyklen im Gelbild zu erkennen sind (Abb. 21). Dabei werden die längeren Nebenprodukte im Vergleich zu den kürzeren bevorzugt amplifiziert (Abb. 60). Das führt dazu, dass die Nukleinsäuren gewünschter Länge dem Selektionsprozess nicht mehr oder nur in geringem Maße zur Verfügung stehen. In den vorherigen SELEX-Methoden wurde die Bildung dieser Überamplifikate trotz der Reinigung der DNA-Ausgangsbibliothek beobachtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht durch zusätzliche Verunreinigungen verursacht wurden, sondern allein durch Überamplifizierung.

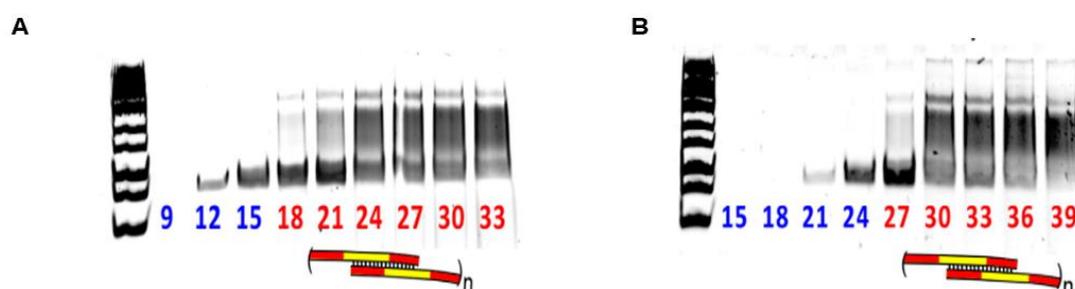


Abb. 60: Die Bildung von Nebenprodukten in einer PCR. Die heterogenen SELEX-Pools bilden konzentrationsabhängig schnell PCR-Produkte, die durch falsche Hybridisierung verursacht werden. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der PCR-Zyklusoptimierung. Die Nummern stehen für die PCR-Zyklenzahl. Panel A: 10^8 Moleküle; Panel B: 10^5 Moleküle. Es ist ersichtlich, wie die Produkte der richtigen Länge zum Vorteil der Überamplifikate verschwinden.¹⁸⁴

Zell-SELEX mit HT-29-Zellen

Auch in der vierten SELEX für das CD24-Molekül wurde darauf geachtet, das System möglichst konstant zu halten. Hierbei wurde das Target stets in seiner nativen Form verwendet. Deswegen wurde hier eine Zell-SELEX bei 4 °C durchgeführt. Dadurch sollte zum einen die unspezifische Internalisierung der Nukleinsäuren verhindert werden, da sonst die von den Zellen aufgenommenen Oligonukleotide dem SELEX-Prozess entzogen werden könnten. Zum anderen wurde dadurch auch eine konstante

DISKUSSION

Zelloberflächen-Zusammensetzung während der Inkubation mit dem DNA-Pool gewährleistet. Es sind bereits Aptamere bekannt, die ebenfalls bei 4 °C selektiert wurden.^{186,187} Bei dieser Temperatur wird nicht nur der Metabolismus der lebenden Zelle verlangsamt, sondern auch die Anzahl der Freiheitsgrade der Nukleinsäuremoleküle reduziert. Somit werden in der Regel bei höheren Temperaturen von Programmen wie z. B. Mfold mehr Sekundärstrukturen vorgeschlagen als bei niedrigeren. Daraus lässt sich ableiten, dass die Faltung der DNA bei niedrigeren Temperaturen bevorzugt sequenz- und pufferspezifisch ist. Die Strukturen der Aptamere sind bei dieser Temperatur stabiler, was sich in höheren Enthalpiewerten widerspiegelt. Da die Aptamere ihre Targets über deren räumliche Ausrichtung erkennen und binden können, können die sich bei höheren Temperaturen zusätzlich ausbildenden Formen zum Affinitätsverlust des Aptamer-Pools führen. Deswegen ist es wichtig, dass die Aptamere relativ stabile Strukturen aufweisen und nicht durch leichte Schwankungen während des Selektionsprozesses beeinflusst werden. Bei den Waschschrritten war es von besonderer Bedeutung, nicht nur die Zellen von unspezifischen Bindern zu befreien, sondern gleichzeitig auch die Adhäsion und somit die Vitalität der Zellen nicht negativ zu beeinflussen. Sonst könnten die potenziellen Aptamere schon in den ersten SELEX-Runden verloren gehen. Die Kontrolle der CD24-Produktion der verwendeten Zellen während der Zell-SELEX diente sowohl der Überwachung der parentalen HT-29-Zellen, als auch der Stabilitätskontrolle der *Knockdown*-Zelllinie. Da die beiden Zelllinien morphologisch identisch waren, war diese Kontrolle wichtig. Um hier die Gefahr des frühzeitigen Verlustes der potenziellen Target-Binder zu umgehen, wurde in der ersten Runde kein Waschschrtritt durchgeführt, wodurch sich die geringe PCR-Zyklenzahl von zwei erklärt (Tab. 41). Das hängt damit zusammen, dass nur wenige unspezifisch gebundene DNA-Moleküle aus dem Selektionspool eliminiert wurden und nach nur wenigen Amplifikationszyklen genug DNA für die nachfolgenden SELEX-Runden erhalten werden konnte. In der zweiten Runde wurde der Pool weiter mit HT-29-Zell-affinen Oligonukleotiden angereichert. Hierbei konnte der Selektionsdruck durch den eingeführten Waschschrtritt ausgeübt werden. Infolgedessen verdoppelte sich die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen. Ab der dritten Runde sollten progressiv die weniger affinen Nukleinsäuren dem Selektionspool entzogen werden. Dafür wurde ab

DISKUSSION

dieser Runde jeweils immer eine negative SELEX mit den HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen vor der SELEX mit den HT-29-Zellen durchgeführt. Der Selektionserfolg dieser stringenten Maßnahme zeigte sich auch durch die 2.5fache Erhöhung der PCR-Zyklusanzahl, da somit die unspezifischen oder dem Target weniger affinen Oligonukleotide dem Selektionspool entzogen werden konnten. Gleichzeitig wurde die Anzahl an den Waschschritten sukzessive erhöht, um immer affinere DNA-Moleküle in dem Pool zu behalten. Außerdem wurden die Menge an Target-produzierenden Zellen (75 cm² bis 9 cm²) sowie die Inkubationszeit (2 bis 0.5 h) während der SELEX reduziert. Bei den CD24 *Knockdown*-Zellen wurde dabei umgekehrt vorgegangen. Hierbei wurden den Oligonukleotiden in jeder Runde mehr Zellen angeboten (9 cm² bis 75 cm²) und die Inkubationszeiten sukzessive erhöht (2 bis 6 h). Um während der zweistündigen Inkubation weiter die Vitalität der Zellen zu gewährleisten, wurden dem Selektionspool nach einer Stunde frische Zellen angeboten. In Runde vier zeigte sich ein Rückgang der Zykluszahl trotz Erhöhung der Stringenz, was auf einen Selektionserfolg hindeutete. Durch die Erhöhung der Konzentration an monovalenten Kationen (Na⁺) und die Verkürzung der Inkubationszeit mit den Targetzellen (R5) wurde ein weiterer Selektionsdruck ausgeübt. Dies wurde durch den Anstieg an benötigten PCR-Zyklen sichtbar. Hierbei könnte vor allem der Einfluss der Ionen ein Grund für die Selektionsstringenz sein.¹⁰⁴ In Runde sechs blieb die Anzahl an PCR-Zyklen trotz Erhöhung der Waschschrritte konstant. In Runde sieben wurde erneut die Konzentration an NaCl, sowie die Zellzahl und Inkubationszeit mit den *Knockdown*-Zellen angehoben, was dazu führte, dass die Zahl der PCR-Zyklen verdoppelt werden musste, um genug DNA-Moleküle zu erhalten, um weitere SELEX-Runden durchführen zu können. Durch diese Maßnahme sollten am Ende im Selektionspool nur solche Moleküle verbleiben, die unter physiologischen Salzkonzentrationen immer noch mit dem Targetmolekül interagieren konnten. Im Gegensatz dazu hatten weder die Reduktion von Targetzellen noch die Erhöhung von *Knockdown*-Zellen einen so erheblichen Einfluss auf die Eliminierung der Oligonukleotide aus dem Selektionspool und somit auf den Selektionsdruck. Daher ist auch hier anzunehmen, dass die Konzentration an monovalenten Ionen einen erheblichen Einfluss auf die Bindung der CD24-Aptamere hat. Die nächste SELEX-Runde zeigte durch den Rückgang der PCR-Zykluszahl, dass eine Anreicherung des

DISKUSSION

Pools an potenziellen Bindern stattgefunden hat. Deswegen wurde in den folgenden Runden die Inkubationszeit mit HT-29-Zellen verkürzt. Ab Runde neun wurde durch Veränderung eines neuen Parameters der Selektionsdruck weiter verstärkt und außerdem die Spezifität des Pools erhöht. Durch Zugabe des Integrin-spezifischen Aptamers IDA sollten dessen Targets, die $\alpha 6$ Integrine spezifisch blockiert werden.^{61,188} Die Zugabe dieses Oligonukleotides führte erneut zu einer erheblichen Zunahme an benötigten PCR-Zyklen (von 16 auf 22). Somit konnte gezeigt werden, dass sich im Pool bereits auch Integrin-bindende Nukleinsäuren befanden. Die These kann dadurch bestärkt werden, dass in den darauffolgenden Runden (R10, 11 und 12) keine weitere Zunahme der PCR-Zyklenzahl erfolgte, obwohl die Menge an IDA von zwei- bis auf das achtfache höher war als die des Selektionspools. Auch die weitere Steigerung der Waschschrte, die die weniger affinen Nukleinsäuren aus dem Selektionspool eliminieren sollte, hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der DNA-Pools. Deswegen wurde die SELEX beendet und ausgewertet. Sowohl die radioaktiven als auch die fluoreszenzbasierten Bindungsstudien (4.5.7.1 und 4.5.7.2) zeigten, dass mit steigender Rundenanzahl auch die Targetaffinität zunahm (Abb. 71 und Abb. 23). Dabei diente Pool 1 als Kontrolle, da dieser im Gegensatz zur der Ausgangsbibliothek doppelsträngig vorlag und genauso wie die restlichen Pools behandelt werden musste. Der Pool nach der sechsten Runde wurde untersucht, da die Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen auch in den zwei früheren Runden (R5-R6) relativ konstant war (7-10) und erst nach Runde sieben um das Zweifache anstieg (18). Da die Tests zeitlich auseinanderlagen wurde bei den radioaktiven Assays als letzte die zehnte Runde verwendet. Hierbei zeigte sich ein stetiger Anstieg der Affinität der DNA-Pools. Bei den durchflusszytometrischen Studien hingegen konnte noch zusätzlich der Pool nach der letzten Runde (R12) getestet werden. Auch hier war eine Erhöhung der Affinität mit steigender SELEX-Rundenzahl zu verzeichnen (Abb. 23). Dies beweist eine erfolgreiche Selektion. Die Affinität gegenüber den *Knockdown*-Zellen blieb stetig konstant. Eine geringere Affinität zu den *Knockdown*-Zellen wurde sowohl bei den DNA-Pools als auch bei der Antikörperbindung beobachtet (Abb. 36). Dies kann unterschiedlich erklärt werden. Zum einen kann diese Affinität durch eine Rest-Produktion von CD24-Molekülen auf den herunterregulierten Zellen zurückzuführen sein. Die Zellen können abhängig von ihrem Zustand, der Passage

DISKUSSION

und äußeren Einflüssen Unterschiede in der Protein-Produktion aufweisen.¹⁷⁵ Dennoch kann diese schwache und mit dem Antikörper vergleichbare Wechselwirkung der DNA-Pools dem Hintergrundrauschen zugeordnet werden. Zum anderen ist es möglich, dass die fluoreszierenden Farbstoffe unspezifisch an Zellen binden können.¹⁸⁹ Bedingt durch Co-Expression kann durch das *Knockdown*-Verfahren auch die Produktion von anderen Oberflächenmolekülen beeinflusst worden sein, was Unterschiede im Bindungsverhalten von Antikörpern und Aptameren zur Folge haben kann.⁶¹

Außerdem wurde ein Diversitätsassay der DNA-Pools mittels Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Als erste Kontrolle diente das Amplifikationsprodukt einer einzelnen DNA-Spezies (76 bp; Abb. 24), die erwartungsgemäß die niedrigste Schmelzkurvenbreite aufwies. Bei der zweiten Kontrolle handelte es sich um die Ausgangsbibliothek, die die größte Streuung in den Schmelzpunkten aufwies. Die Ergebnisse zeigten, dass die signifikanteste Reduktion der DNA-Pool-Diversität nach der zweiten und zehnten Selektionsrunde auftrat. Nach der zehnten SELEX-Runde blieb die so gemessene Diversität des Pools konstant. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den Bindungsstudien (Abb. 23 und Abb. 24). Dabei war es wichtig, die Qualität des Pools für den Diversitätstest mittels PAGE zu überprüfen. Während der hier beschriebenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Bildung von Überamplifikaten zum Absinken der Schmelzpunkte und zu einer größeren Streuung der Schmelzpunkte führte, was somit die Ergebnisse dieses Tests verfälschen konnte (Abb. 25). Nichtsdestoweniger wurde gezeigt, dass dieser Diversitätsassay als schnelle und kostengünstige Methode zur Überprüfung des Selektionsfortschritts dienen kann.

6.1.1 Klonierung und Sequenzierung des HT-29 affinen SELEX-Pools

Der Pool nach der 12. Selektionsrunde wurde kloniert (4.2.4.2) und Plasmide aus 59 positiven Bakterienkolonien mittels Sanger-Sequenzierung (4.2.7.1) weiter analysiert. Die Kontrolle der Klonierung wurde mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings (4.2.5.3) sowie der Kolonie-PCR (4.2.5.4) durchgeführt. Aufgrund dessen, dass viele Kolonien entweder blau waren oder sich mit der Zeit blau verfärbten, wurden auch exemplarisch Plasmide dieser Bakterienkolonien (blau, 2; 5; 6; 26; 26; 43; 50; 68; 74) sequenziert

DISKUSSION

(4.2.7.1). Entgegen der Erwartungen war auch in den Plasmiden der blau gefärbten Kolonien das gewünschte Insert vorhanden. Die Insertion (76 nt) sollte zur Verschiebung des offenen Leserahmens (ORF *open reading frame*) führen. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Plasmid-Insertion nicht ausreichend war, um die Funktion der β -Galactosidase *per se* zu unterbinden. Nach dem Sequenzieren zeigte sich, dass die blau gefärbten Kolonien kein *ochre* Stop-Codon (UAA) im randomisierten Abschnitt des Insertbereichs und somit auch nicht in dessen mRNA trugen. In dem Insert dieser Bakterien wurde allerdings das Vorhandensein der zwei weiteren Stop-Codons: *amber* und *opal* festgestellt. Da alle getesteten Bakterienkolonien gewünschte Inserts trugen, konnte die TOPO-TA-Klonierung als verlässliche und effiziente Methode gewählt werden. Das Blau-Weiß-Screening funktionierte nicht immer zuverlässig, vor allem wenn die Inserts kurz waren oder nicht in einer Verschiebung des Leserahmens resultierten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zur Identifizierung gewünschter Insertionen der hier vorliegenden Länge eine Kolonie-PCR sicherer ist und auf ein vorausgehendes Blau-Weiß-Screening verzichtet werden kann.

Nach dem Sequenzieren des letzten CD24-DNA-Pools konnten die Sequenzen für 59 DNA-Moleküle analysiert werden. Dabei wurden einige Oligonukleotide gefunden, die eine von den Erwartungen abweichende Länge des randomisierten Bereichs aufwiesen. Diese Unterschiede können entstehen, wenn z. B. Basen in dem Amplifikationsschritt „überlesen“ werden. Das kann durch Ausbildung bestimmter Strukturen hervorgerufen werden. Auch Polymerasefehler oder Sequenzierungsfehler sind dabei nicht auszuschließen. Unter den untersuchten 59 Molekülen aus dem Selektionspool wurden zwei Sequenzen wiederholt vorgefunden (1 x 2 und 1 x 3 Moleküle) und insgesamt waren 46 der Oligonukleotide eng miteinander verwandt (Abb. 77). Nach dem Vergleich der resultierenden DNA-Moleküle konnten 17 Nukleoside (16 x A und 1 x C) in die Consensus-Sequenz eingeordnet werden (Abb. 77). Das ergibt einen Verwandtschaftsgrad der DNA-Moleküle innerhalb des Pools von 43%. Bei der Suche nach ähnlichen Sequenz-Motiven der DNA-Moleküle konnten drei solcher Sequenzabfolgen identifiziert werden (Abb. 26). Dabei ähnelt das erste Motiv durch das Vorhandensein vieler Adenosine der Consensus-Sequenz der 59 DNA-Moleküle, die aus der Klonierung der letzten SELEX-Runde resultierten

DISKUSSION

(Vergleich Abb. 77 und Abb. 26). Das Motiv ist 29 Nukleotide lang und kommt bei 50 Molekülen vor. Bei weiteren sieben DNA-Molekülen ist es in revers-komplementärer Anordnung zu finden. Das zweite Motiv (Abb. 26) besteht aus elf Nukleotiden und kommt bei drei Molekülen vor (Tab. 44). Allerdings sind die Nukleinbasen dieses Motives konserviert. Das dritte Motiv dagegen war mit sieben Nukleotiden relativ kurz und kam nur bei zwei Nukleinsäuren vor. In der Folge wurden zunächst Nukleinsäuren der zwei ersten Motive sowie solche, die keines dieser Motive aufwiesen (CD24_29; 42 und _60) auf die Bindung zu den Targetzellen getestet.

6.1.2 Bindungsstudien der Oligonukleotide aus der SELEX für CD24

Für den radioaktiven *Pulldown*-Assay (4.5.7.1) wurden 15 Oligonukleotide, die eines der Motive 1 oder 2 oder keines davon beinhalteten, ausgesucht. Die Zellen wurden mit den radioaktiv markierten Nukleinsäuren inkubiert und die Menge an Radioaktivität auf den Zellen sowie in den jeweiligen Waschfraktionen anschließend berechnet (Abb. 27). Dabei zeigten die Nukleinsäuren mit den Nummern 19, 31, 52 und 60 die höchste Affinität gegenüber den Targetzellen. Die Oligonukleotide, deren Sequenzen unter den 59 Klonen wiederholt vorkamen, wiesen keine oder nur eine sehr geringe Affinität gegenüber den Targetzellen auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Nukleinsäure mit der Nummer 60, die sich von diesen wiederholt vorkommenden, nichtbindenden DNAs nur durch eine Basendeletion unterschied (CD24_36; _49 und _63) eine Affinität für die Targetzellen (Tab. 42). Dabei zeigten sich bei den Mfold-Vorhersagen für diese Oligonukleotide (CD24_36; _49; 63 vs. _60) unterschiedliche 2D-Strukturen, was ein Hinweis auf die Unterschiede in der Affinität sein konnte.

Bei den untersuchten Repräsentanten, die eines der beiden Motive in deren Sequenz trugen, wurden unterschiedliche Affinitäten gegenüber den Targetzellen festgestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung an das CD24-Molekül auf keinem dieser zwei Motive allein basiert. Bei den Molekülen CD24_2 und _5 (Motiv 1 und 3) sowie CD24_36; _40 und 63 (Motiv 1 und 2) konnten gleichzeitig zwei der drei Sequenzmotive identifiziert werden. Die Oligonukleotide CD24_2 und _5 hatten die dritte Nukleobasenabfolge (Tab. 44) in ihrer Sequenz und zeigten von den 59 DNA-Molekülen die höchste Wahrscheinlichkeit GQs auszubilden (G-Scores von 21). Die nachfolgenden Bindungsstudien wiesen darauf hin, dass das Motiv 3 (GCCTTGC)

DISKUSSION

und/oder die Ausbildung von GQs für die Bindung an Targetzellen (Abb. 28 und Tab. 66) wichtig waren.

Das Phänomen, dass Moleküle der am häufigsten vorkommenden Sequenzfamilie keine Bindung an ihr Zielmolekül aufwiesen, wurde schon früher beobachtet.¹⁹⁰ Dies konnte möglicherweise dadurch verursacht werden, dass manche der Oligonukleotide leichter amplifiziert werden und somit in dem Selektionspool überrepräsentiert sind. Andererseits ist es möglich, dass manche der Oligonukleotide leichter kloniert werden oder wie bei der NGS-Messung leichter durch die Brückensynthese sequenziert werden können. Im Fall von GC-reichen DNA-Molekülen kann durch die Ausbildung von intramolekularen Stammschleifen das Fortschreiten der Polymerase erschwert und die Amplifikation gehemmt werden.^{191,192}

In der Auswertung zeigte sich, dass die Affinitäten der beiden untersuchten besten Binder gegenüber den Targetzellen vergleichbar waren (Abb. 28 und Tab. 45). Für alle HT-29-Interaktionspartner aus den beiden Assays (CD24_2; _5: _19; _31; _52 und _60) wurden die Dissoziationskonstanten mittels Durchflusszytometrie (Abb. 28 und Tab. 45) bestimmt. Die Behandlung mit Trypsin oder Accutase hatte dabei keinen negativen Effekt auf die CD24-Produktion, was durch die unveränderte Affinität des CD24-Antikörpers bestätigt werden konnte (Abb. 63). Nur lebende Zellen (Propidiumiodidfärbung (PI) negativ) wurden hinsichtlich ihrer Antigenproduktion und der Aptamer-Bindung analysiert. Die K_d -Werte wurden unter Verwendung des *One-site*-Bindungsmodells (Gl. 5) berechnet und lagen im Bereich von 18 bis 709 nM (Tab. 45). Die Aptamere mit der höchsten Affinität waren CD24A_2 und CD24A_5 (Tab. 45). Es ist ersichtlich, dass die Oligonukleotide, die mit den HT-29-Zellen weniger stark interagierten (Abb. 28), auch weniger Bindung an die *Knockdown*-Zellen zeigten. Deswegen kann die geringe Interaktion des Aptamers mit den HT-29 CD24 kd-Kontrollzellen durch die restliche CD24-Produktion erklärt werden.

In einem SELEX-Experiment ist auch die Konzentration anderer Komponenten, wie z. B. Calcium- und Magnesiumionen wichtig, da diese einerseits für die richtige Faltung der Aptamere von Bedeutung sind, aber auch weil sie physiologisch vorkommen. Dabei ist zu beachten, dass diese Ionen die Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren stabilisieren können. Allerdings sollte die Konzentration dann auch den Bedingungen der späteren Anwendung angepasst werden, um mögliche, ansonsten bedingte

DISKUSSION

Konformationsänderungen zu vermeiden. Die Aptamere, die gegenüber dem Target die höchste Affinität zeigten, hatten auch deutlich stabilere Enthalpiewerte als die weniger affinen (Mfold-Vorhersage; Tab. 45). Das hängt damit zusammen, dass dadurch gewährleistet wird, dass die DNA-Moleküle eine homogene Faltung aufweisen und zuverlässiger ihre Substrate erkennen können. Dieses Phänomen hatten sich auch McLaughlin *et al.*, zur Selektion der *switchable* (schaltbaren) Aptamere zu Hilfe genommen.¹⁹³ In dieser Arbeit konnte eine salzbedingte (NaCl) Abnahme der Nukleinsäureaffinität während des SELEX-Prozesses (Tab. 41) beobachtet werden.

6.2 Charakterisierung der Aptamere für CD24

Die Gegenüberstellung der Mfold-Vorhersagen für die Aptamere CD24A_2 und _5 zeigte eine Übereinstimmung der 2D-Strukturen beider Oligonukleotide (Abb. 26). Das war zu erwarten, da sich die beiden Oligonukleotide lediglich in einem einzelnen Basenaustausch unterschieden. Nach dem Austausch aller Thymidin gegen Uridin konnte die 3D-Strukturvorhersage mit Hilfe von SimRNAweb durchgeführt werden. Viele bisherige Publikationen über Aptamer-Strukturen haben Strukturvorhersagen nur basierend auf 2D-Mfold-Darstellungen betrachtet.^{61,194} Allerdings entspricht die 3D-Vorhersage eher der Realität. Bei dem CT916-Aptamer (Cholera-Toxin Aptamer) konnte gezeigt werden, dass die 3D-Vorhersage mit Hilfe von SimRNAweb mit den Messergebnissen der Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) übereinstimmte.¹⁹⁵ Es ist ersichtlich, dass die 3D-Faltungen der beiden Aptamere (CD24A_2 und _5) im Gegensatz zu den 2D-Mfold-Berechnungen Unterschiede aufweisen. Da die Moleküle CD24A_2 und _5 aber mit vergleichbarer Affinität und Spezifität die Targetzellen binden können, scheinen diese Differenzen in den Faltungen keinen Einfluss auf die Erkennung der Bindungsstelle zu haben. Beide Aptamere können ein GQ mit gleicher Stabilität ausbilden. Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass die GQ-Regionen dieser Oligonukleotide für die Interaktion mit dem Targetmolekül verantwortlich sein könnten. Außerdem scheinen die Bereiche an den den GQs gegenüberliegenden Enden (Abb. 31: CD24A_2 und Abb. 32: CD24A_5; links dargestellt) strukturell ähnlich zu sein.

DISKUSSION

Da die Affinitäten, Strukturen und Sequenzen der beiden besten Binder vergleichbar waren, wurde die weitere Charakterisierung überwiegend mit CD24A_2 durchgeführt. Die Struktur des Aptamers wurde mittels CD-Spektroskopie weiter untersucht (Abb. 33 und Abb. 35). Hierbei können optisch aktive Moleküle anhand ihrer Differenz in der Absorption von links oder rechts zirkular polarisiertem Licht detektiert werden. Durch die daraus resultierende Änderung der Amplitude können Tertiärstrukturen wie z. B. A-, B- und Z-DNA unterschieden werden. Auch Stammschleifen aus B-DNA und Quadruplexe können anhand ihrer CD-Absorptionsmuster identifiziert werden.^{196,197} Die charakteristischen Kurvenverläufe beider Struktur motive sind in Abb. 61 dargestellt.

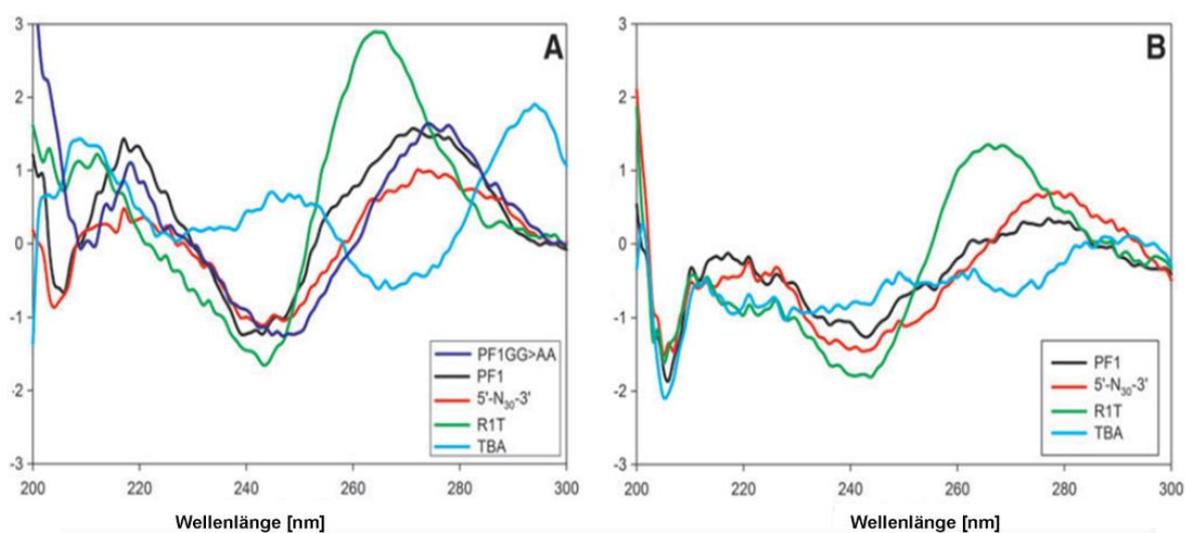


Abb. 61: CD-spektroskopische Untersuchung verschiedener DNA-Strukturen. Durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima und -minima lassen sich GQ (TBA; hellblau: antiparalleler und R1T; grün: paralleler GQ) von B-Form DNA (PF1GG>AA; violett, PF1; schwarz: und 5'-N₃₀-3') unterscheiden. Die Abbildung wurde Lai *et al.*, entnommen.¹⁹⁸ Panel A: kaliumhaltiger Puffer; Panel B: natriumhaltiger Puffer. Es ist die Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen.

Die Analyse der CD-Spektroskopie ergab, dass das CD24A_2 Oligonukleotid die mittels Mfold vorhergesagten GQ unabhängig von der Anwesenheit verschiedener Ionen ausbildet (Abb. 33). Die Absorption des Aptamers CD24A_2 (Abb. 33; grün, schwarz, blau und magenta), welches bei 220 und 265 nm ein Minimum und bei 245 nm ein Maximum aufwies, sind vergleichbar mit dem Kurvenverlauf des Aptamers R1T, für welches die parallele GQ Struktur bestimmt wurde (Abb. 61). Das Aptamer CD24A_2 zeigt bei Abwesenheit von Metallionen (Abb. 33; orange) einen zu den Aptameren 5'-N₃₀-3', PF1 und PF1GG > AA (Panel A: Abb. 61; rot, dunkel blau und schwarz) analogen Verlauf der Absorptionsspektren. Das deutet darauf hin, dass

DISKUSSION

dieses Aptamer in Abwesenheit der genannten Ionen statt des GQ eine B-DNA-Stammschleife ausbildet. Es ist ersichtlich, dass bei den fünf Aptameren der Tausch der monovalenten Ionen (K^+ gegen Na^+) zum Verlust der GQ-Struktur (Panel B; Abb. 61; blau) oder zu einer Reduktion der Elliptizitätswerte um 60% führte (Panel B; Abb. 61; grün). Bei dem Aptamer CD24A_2 konnte dagegen gezeigt werden, dass auch in natriumhaltigem Puffer (Abb. 33; blau) die GQ-Struktur ausgebildet wird. Hierbei führte der Ionentausch zu einem Rückgang von 27% in der Differenz zwischen der Absorption des linkszirkularpolarisierten und des rechtszirkularpolarisierten Lichtstrahls. Das kann auf die höhere Stabilität der GQ-Struktur des Aptamers CD24A_2 zurückzuführen sein. Durch die Zugabe von Kaliumionen können GQs weiter stabilisiert werden (Abb. 33: Unterschied zwischen blau und schwarz). Aus den CD-Spektren ergibt sich folgender Zusammenhang der Stabilisierung des CD24A_2-Aptamers bezüglich der Anwesenheit monovalenter Kationen: $K^+ > Na^+ > Li^+$. Das steht im Einklang mit Berichten aus der Literatur.¹⁹⁹ Allerdings war es bei dieser Messung nicht mehr von Bedeutung, ob neben Kaliumionen auch Natriumionen vorhanden waren (Abb. 33; petrol), da die Zugabe von Natriumionen zu keiner weiteren Veränderung im Vergleich zur Anwesenheit von Kaliumionen alleine führte. Anders als bei anderen Aptameren zeigte sich, dass das CD24A_2 Oligonukleotid auch in Gegenwart von Lithiumionen die GQ ausbilden konnte (Abb. 33). Zum Beispiel wurde die GQ-Bildung des AIR-3A-Aptamers durch die Anwesenheit der Lithiumionen gehemmt (bis zu 100 mM gemessen).^{200,201} Diese Erkenntnis kann die hohe Stabilität der GQ-Struktur von CD24A_2 weiter bestärken. In den weiteren Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die beiden Aptamere (Abb. 34; CD24A_2 und _5) nach Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C immer noch mit vergleichbaren Affinitäten an Targetzellen binden konnten. Der K_d -Wert wurde für diese Temperatur nicht berechnet, da bei 37 °C auch eine unspezifische Internalisierung infolge der Endozytose stattfand. Diese Zellaufnahme ist bei Körpertemperatur am größten und am schnellsten. Es wurde im Falle des Aptamers IDA gezeigt, dass bereits nach 10 Min. bei 37 °C 98% der vorhandenen Nukleinsäuren von den Zellen internalisiert wurden.⁶¹ Deswegen konnte bei dieser Temperatur nicht zuverlässig ermittelt werden, wieviele der Aptamer-moleküle tatsächlich spezifisch mit den Zellen interagieren und wieviele infolge unspezifischer

DISKUSSION

Internalisierung aufgenommen und deshalb detektiert wurden. Somit könnte die Bestimmung der Dissoziationskonstante bei 37 °C zu einem unrealistischen Wert führen. Die CD-Spektroskopie bestätigte, dass die GQs bei beiden untersuchten Temperaturen (Abb. 33: 4 °C und Abb. 35: 37 °C) ausgebildet wurden.

Aus den CD-Spektren ergab sich folgender Zusammenhang zur Stabilisierung der GQs durch monovalente Ionen für die beiden Temperaturen bei denen die Bindung des Aptamers an Targetzellen beobachtet wurde: NaCl 37 °C > NaCl 4 °C > KCl 37 °C > KCl+NaCl 37 °C > KCl 4 °C = KCl+NaCl 4 °C. Die Auswertung der CD-Messung bei 37 °C zeigte, dass die Zugabe von Natriumionen neben den Kaliumionen hier doch einen weiteren stabilisierenden Einfluss auf die GQ-Bildung ausübte. Dies konnte bei der Messung bei 4 °C nicht beobachtet werden. Der Grund dafür könnte darin gelegen haben, dass bei der niedrigeren Temperatur durch die Anwesenheit von Kaliumionen allein schon die stabilste Struktur ausgebildet wird. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Stabilität und Konformations-Homogenität der GQ des Aptamers CD24A_2 (unter verschiedenen ionischen Bedingungen und Temperaturen) darauf hindeuten, dass es in verschiedenen Puffersystemen verwendet werden könnte. Dies öffnete zusätzliche Möglichkeiten für die spätere Anwendung dieses Aptamers.

Der Vergleich der Bindung des CD24-Aptamers (Abb. 36; blaue Linie) und des CD24-Antikörpers (Abb. 36; orange Linien) mit den HT-29 und den HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen (Abb. 36; durchgezogene bzw. gepunktete Linie) zeigte, dass das Aptamer besser zwischen den beiden Zellen differenzieren kann und somit ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis (33% höher) als sein Protein-Pendant aufweist. Das macht das Aptamer besonders interessant für den potenziellen Einsatz in der Diagnostik oder sogar in der Therapie.

Außerdem können diese beiden CD24-Binder (CD24A_2 und ML-5 Antikörper) zusammen eingesetzt werden, da sie nicht um die gleiche Bindungsstelle an dem Targetmolekül kompetieren (Abb. 37). Es konnte in einer durchflusszytometrischen Studie gezeigt werden, dass durch die Zugabe des ML-5 Antikörpers die Interaktion des Aptamers mit den Targetzellen nicht beeinflusst werden konnte. Da der ML-5 Antikörper nicht mit dem glykosylierten Teil des Moleküls interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass das Aptamer mit den kohlenhydrathaltigen Seitenketten

DISKUSSION

wechselwirken könnte. Weiterführende Studien könnten hierüber Klarheit schaffen. Da der ML-5 Antikörper an den nicht-glykosylierten Proteinkern, jedoch nicht an die P-Selektin-Bindungsstelle bindet, besteht noch die Möglichkeit, dass das Aptamer über diese Bindungstasche mit dem Targetmolekül interagieren könnte.⁷³

Für die *in vivo* Anwendung von Aptameren spielt auch ihre Stabilität eine wichtige Rolle. Da nicht-modifizierte Aptamere aus dem Blutstrom mit einer Halbwertszeit von Minuten bis Stunden schnell verschwinden, wurde auch die Beständigkeit des CD24A_2 Aptamers untersucht (Abb. 38; Abb. 79 und Abb. 80). *In vivo* werden Aptamere hauptsächlich durch Nukleasen abgebaut oder aber auch aufgrund ihrer niedrigen Molekulargewichte auf renalem Weg ausgeschieden.²⁰² Wie aus Abb. 79 ersichtlich, ist das DNA-Aptamer im RPMI-Medium über mehrere Stunden stabil. Bei dieser Untersuchung lagen nach 24 h noch 60% des Aptamers intakt vor (Abb. 38). Die Zugabe von FKS mit einer finalen Konzentration von 10% zu dem Medium, resultierte nach der gleichen Inkubationszeit in einem vierfachen Rückgang der Menge an Vollängen-DNA (Abb. 38). Dies ist auf die in fötalem Kälberserum vorliegenden Nukleasen zurückzuführen.¹⁶⁶ Die berechnete Halbwertszeit des Aptamers lag bei 1.6 h und war damit mit Werten aus der Literatur vergleichbar. So wurde z. B. für das Aptamer SDA nach Zugabe von FKS mit einer finalen Konzentration von 10% eine Halbwertszeit von 1.5 h bestimmt.

Ein noch besserer Schutz vor dem Abbau durch Nukleasen bestünde für Aptamere, wenn sie in gebundener Form vorlägen.²⁰³ Außerdem könnten die Nukleinsäuren zusätzlich mit Hilfe der *Click*-Chemie oder in einer PCR schnell funktionalisiert werden, um deren Beständigkeit gegenüber den Nukleasen weiter zu steigern.^{47,182,204} Nach solch einer post-selektiven Modifizierung müssten allerdings erst die Affinität und die Spezifität des resultierenden Aptamers getestet werden. In der Literatur wird davon berichtet, dass die Modifikationen zum Verlust der gewünschten Aptamereigenschaften führen können.⁶¹ Es gibt aber auch einige Gegenbeispiele.^{190,205}

Um die Internalisierung des Aptamers zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Oligonukleotid bei 4 °C und bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation und vier Waschschritten wurde dem Komplex DNase zugefügt und dieser weiter bei 37 °C inkubiert. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung bestätigte

DISKUSSION

sich wiederum, dass die Bindung des Aptamers bei den beiden Temperaturen vergleichbar war. Die Hydrolyse bei 4 °C resultierte in einem starken Rückgang der Fluoreszenzverschiebung um 93%. Somit lässt sich folgern, dass die Aptamere, die an der Oberfläche der Zellen gebunden waren, fast komplett zersetzt wurden. Dabei ist denkbar, dass die Aptamere nicht vollständig hydrolysiert wurden, wenn sie durch die Wechselwirkung mit anderen Molekülen vor dem Abbau geschützt wurden (*DNA footprinting*).²⁰³ Der Rückgang in den Fluoreszenzwerten kann also dadurch verursacht worden sein, dass das Cy5-markierte 5'-Ende nicht an der Interaktion mit dem Targetmolekül beteiligt war und somit einfach abgespalten wurde. Bei der Restfluoreszenz kann es sich um wenige Oligonukleotide handeln, die durch das Erwärmen auf 37 °C schnell internalisiert wurden, bevor sie dem Einfluss der Nukleasen ausgesetzt werden konnten. Außerdem kann noch ein kleiner Teil unspezifisch durch die Zellen gebunden worden sein, da bekannt ist, dass die Zellen stark an Fluoreszenzfarbstoffe binden können.¹⁸⁹ Allerdings ist zu bemerken, dass noch 31% des Fluoreszenzsignals detektiert werden konnten, wenn das Aptamer mit den Zellen bei 37 °C inkubiert wurde. Das könnte bedeuten, dass ca. 30% der Aptamere internalisiert wurden und somit nicht mehr durch die Nuklease abgebaut werden konnten. Das steht im Einklang mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass die CD24-vermittelte Internalisierung zwischen 8 und 39% lag.²⁰⁶

6.2.1 Selektion von Aptameren für das CD54-Molekül

Um Aptamere für das CD54-Molekül (ICAM-1) zu selektieren, wurden 13 SELEX-Runden einer Zell-SELEX durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde vor allem über die Inkubationszeit (60-33 Min.) angepasst. Bei dieser SELEX war die Gefahr hoch, dass durch das Einführen der negativen Selektion die potenziellen Targetbinder durch die unspezifische Internalisierung dem Selektionspool hätten entzogen werden können. Deswegen wurde hierbei erst der Selektionspool mit den Targetzellen (über drei Runden) angereichert. Erst ab Runde 4 wurde eine negative Selektion mit einbezogen, hier lagen die Inkubationszeiten mit dieser Zelllinie konstant bei 30 Min. Die PCR-Zyklusanzahl blieb während der SELEX abgesehen von Runde 5 (Tab. 63; weniger Zyklen) und Runde 10 (Tab. 63; mehr Zyklen) konstant. Der Rückgang in der Anzahl benötigter PCR-Zyklen, um ausreichende Mengen an DNA-Molekülen für die

DISKUSSION

nachfolgenden SELEX-Runden zu amplifizieren, kann dadurch erklärt werden, dass der Selektionsdruck in den letzten zwei SELEX-Runden konstant gehalten wurde. Der Anstieg der PCR-Zyklenzahl nach der zehnten SELEX-Runde kann auf das Einführen des zusätzlichen Waschschrilles zurückzuführen sein. Die Verdünnung des Selektionspools könnte durch das Entfernen der weniger affinen Nukleinsäuren erfolgt sein. Außerdem ist denkbar, dass sich bei dem zusätzlichen Waschschrill ein Teil der Zellen abgelöst hat und somit die daran gebundenen Oligonukleotide dem Selektionspool entzogen wurden.

In dieser Arbeit wurde mehrfach darauf hingewiesen, dass die HTC116-Zellen den CD54-Antikörper mit guter Affinität binden konnten. Der Test mit dem HCT116 CD54 *Knockdown*-Zellen bestätigte jedesmal (Abb. 72), dass die Produktion des Targets mit der shRNA-Technik stabil unterdrückt wurde. Die Bindungsassays (radioaktiv und durchflusszytometrisch) zeigten, dass eine erfolgreiche Anreicherung an Targetbindern (DNA-Bibliothek, Pool 5, Pool 7, Pool 10 und Pool 13) stattgefunden hatte. Währenddessen blieb die Affinität zu den *Knockdown*-Zellen konstant niedrig. Auch hier zeigte die post-selektive Fluoreszenzmarkierung des DNA-Pools keinen relevanten Einfluss auf die Bindungseigenschaften.

Wie aus Abb. 41 ersichtlich, weisen die radioaktiv markierten DNA-Pools nach der ersten und nach der siebten Runde fast die gleiche Affinität gegenüber den Targetzellen (HCT116) auf. Dies kann daran liegen, dass der Affinitätsunterschied zwischen den Pools unter der Detektionsgrenze der Methode lag und somit minimale Unterschiede in Anreicherungen nicht beobachtet werden konnten. Dies würde auch erklären, warum die Prozentsätze der Affinitäten, die aus diesen radioaktiven Assays resultierten, niedrig lagen. Hinzu kommt noch, dass sowohl das Sterben von Zellen als auch das unspezifische Internalisieren der Oligonukleotide zum Verfälschen der Ergebnisse hätte führen können. Im Vergleich zu den Runden 1 und 7 stieg die Affinität des Pools nach der 13. Runde gegenüber den Targetzellen um das Dreifache an. Die Affinität der Pools gegenüber den ICAM-1 *Knockdown*-Zellen blieb konstant niedrig. Dies ist ein guter Hinweis auf den Erfolg des SELEX-Prozesses. Außerdem zeigte dieser Pool keinerlei Affinität zu den PC3-Zellen, obwohl diese Zellen das ICAM-1-Molekül ebenfalls präsentieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass der selektierte Pool die ICAM-1-Form bindet, welche auf den HCT116, aber nicht auf den PC3-Zellen

DISKUSSION

vorkommt. Möglich wäre auch, dass hierbei durch das Herunterregulieren des ICAM-1 auch die Produktion anderer Moleküle beeinflusst wurde. Deswegen könnte es in diesem Fall sein, dass ein anderes Molekül, dessen Produktion durch die *Knockdown*-Technik ebenfalls unterdrückt wurde und nicht von den PC3-Zellen produziert wurde, von dem DNA-Pool adressiert wurde. Dies trat beispielsweise im Falle der PC3 β 4 *Knockdown*-Zellen, wo die shDA-Technik zusätzlich im *Knockdown* von α 6-Intergrin und nicht nur in der β 4-Form resultierte. Somit konnte das IDA-Aptamer, welches mit Hilfe der PC3-Zellen und den PC3 β 4 *Knockdown*-Zellen selektiert wurde, spezifisch die α 6-Untereinheit des Zielproteins erkennen und mit hoher Affinität binden (140 nM). Die Ergebnisse der Diversitätsstudien spiegelten die Resultate der Bindungsstudien wieder. Somit wurde bestätigt, dass der in der vorliegenden Arbeit modifizierte, schnelle und vor allem kostengünstige Diversitätsassay mittels Schmelzpunktanalyse zur Evaluation des SELEX-Fortganges dienen konnte.

Nach dieser Selektion konnten 50 DNA-Moleküle mittels Sanger-Sequenzierung analysiert werden. Der Vergleich der Sequenzen (Abb. 83) dieser Oligonukleotide zeigt fünf Basen in der Consensus-Region (CTTTT). Somit ergibt sich ein Verwandtschaftsgrad der Sequenzen zwischen den resultierenden DNA-Molekülen von 12.5%.

Die drei Sequenzmotive, die innerhalb der Nukleinsäuren aus dem letzten Selektionspool für CD54 gefunden wurden (Abb. 42 und Tab. 46), zeigten keine Ähnlichkeiten mit den Motiven, die für die DNA-Moleküle nach der Selektion für das CD24-Protein gefunden wurden. Das lässt darauf schließen, dass diese Nukleotidabfolgen bei den beiden Produkten der jeweiligen Selektion (bzgl. des Targets oder der Methode) spezifisch sind. Dabei wurden diese Motive nur einzeln bei den randomisierten Bereichen der Oligonukleotide gefunden. Für die nachfolgenden Bindungsstudien wurden Vertreter dieser drei Klassen ausgesucht, bei denen die Motive in der *forward* Ausrichtung vorkamen. Zusätzlich wurden Bindungsstudien mit solchen Nukleinsäuren durchgeführt, die mit unterschiedlichen G-Scores bewertet worden waren (6-19). Diese Nukleinsäuren besitzen somit unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten GQs auszubilden. Allerdings zeigte keines dieser Merkmale einen Einfluss auf die Bindung an die ICAM-1 tragenden HCT116-Zellen. Als bester und gleichzeitig einziger Binder (aus zehn getesteten Oligonukleotiden), das nicht

DISKUSSION

gleichermaßen an die *Knockdown*-Zellen band, wurde CD54_45 identifiziert. Dieses Molekül ist laut Prognose in der Lage, zwei verschiedene GQs gleichzeitig auszubilden. In diesem Pool nach der 13. Runde wurde noch ein weiteres Molekül (CD54_7) gefunden, welches diese strukturelle Eigenschaft besitzt. Deswegen wäre es interessant zu erfahren, welche Bindungseigenschaften CD54_7 gegenüber den Targetzellen aufweist. Auch bei den ersten Bindungsstudien der DNA-Moleküle aus dem letzten SELEX-Pool für ICAM-1 schien die Nukleinbasenabfolge keine Rolle für die Targetaffinität zu spielen. Bei den Pools nach der CD24-SELEX war dagegen keines der DNA-Moleküle in der Lage, mehr als einen GQ innerhalb der 76 nt auszubilden. Das legt die Vermutung nahe, dass diese multiplen GQ-Strukturen speziell bei der Interaktion mit CD54 bevorzugt werden. Das wurde auch durch die Bindung des Oligonukleotides CD54_45 (Abb. 43) an die Targetzellen weiter bestärkt.

6.2.2 Selektion von Aptameren für Embp Molekül

Für das Target-Protein Embp aus der Oberfläche von *S. epidermidis* wurden insgesamt drei SELEX-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden zwei Fragmente (Embp125 und Embp170) des rekombinanten 1 MDa Proteins als Targets genutzt, die durch ihre Interaktion mit der FNIII in Verdacht stehen, für das pathogene Verhalten dieses Bakteriums verantwortlich zu sein.¹³⁴

6.2.2.1 Selektion der Aptamere für Embp125

Für das Target Embp125-Molekül wurde bis Runde 9 eine konventionelle und ab Runde 10 eine Kompetitions-SELEX (Tab. 38) durchgeführt. Hierzu war es wichtig, dass der Ligand FNIII von Embp125 immobilisiert vorlag, da diese sich als geeignete Konformation für die Bindung zwischen den beiden Proteinen erwies und bereits nachgewiesen werden konnte, dass die beiden Proteine nur unter diesen Umständen miteinander wechselwirken können.¹⁵² Der Selektionsdruck wurde hier durch das Waschen (erhöhtes Volumen und mehr Waschschrte), das Volumen der SELEX-Ansätze, die Reduktion der Mg^{2+} -Konzentration (0.50-0.25 mM) sowie durch das Einführen von dynamischeren Inkubationsbedingungen (300-500 rpm) ausgeübt. Die Reduktion der Magnesiummenge sollte dazu führen, dass die Affinität der resultierenden Aptamere unabhängig von der Konzentration dieser Ionen war. Während der gesamten SELEX blieb die Anzahl an PCR-Zyklen konstant. Lediglich

DISKUSSION

nach Runde 10 war ein Rückgang in der Anzahl der benötigten Amplifikationszyklen zu verzeichnen (14 auf 5). In dieser Runde wurde die Kompetitions-SELEX eingeführt. Dem lag die Vermutung zugrunde, dass der DNA-Pool eine hohe Affinität zu dem Targetkomplex haben könnte. Durch radioaktive Bindungsstudien wurde sowohl die Affinität zu den Embp125-*Beads* als auch zu dem Komplex (Embp125-FNIII-*Beads*) bestätigt. Da die Bindung an die mit Targetproteinen und die mit dem Komplex beladenen *Beads* (Abb. 44) vergleichbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass aus dem Pool erfolgreich bindende Moleküle für das Embp125 selektiert wurden. Es lässt sich auch folgern, dass die DNA-Pools (Runde 5, 9 und 11) vorwiegend mit den Embp-Epitopen außerhalb der FNIII-Bindungstaschen interagierten. Die Anreicherung des DNA-Pools an die Targetaffinen Moleküle zeichnete sich durch einen Rückgang in der Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen aus, da die meisten Nukleinsäuren eluiert wurden. Für die radioaktiven Bindungsstudien wurden die Pools (DNA-Bibliothek, Pool 10 und Pool 17) in einer PCR durch den Einbau von α -³²P-dTTP radioaktiv markiert. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien bestätigten, dass ein Selektionserfolg gegenüber den mit Target beladenen *Beads* zu verzeichnen war (Abb. 45).

Bei dem Vergleich ähnlicher Motive innerhalb des Pools war zu sehen, dass die Oligonukleotide zwei der gefundenen Motive (Abb. 46; 1 und 2 oder 1 und 3) beinhalteten. Anders als bei dem Pool nach der Selektion für ICAM-1, wo nur ein Motiv zu finden war. Dabei zeigten die durchgeführten Studien, dass zwischen den Motiven und der Affinität der Nukleinsäuren kein eindeutiger Zusammenhang zu sehen war. Es wäre nun noch interessant zu erfahren, welche Affinität die Nukleinsäure mit der Nummer 185 gegenüber dem Target hat, da diese in der Lage ist, drei prognostizierte GQ-Strukturen auszubilden.

6.2.2.2 Selektion der Aptamere für Embp170

Für das Fragment Embp170 wurden parallel zwei SELEX-Methoden durchgeführt. Zunächst handelte es sich um die konventionelle Methode (N-SELEX). Bei der weiteren C-SELEX wurden die Oligonukleotide vor der Inkubation mit dem Protein erst mit zu den Primerregionen komplementären DNA-Fragmenten hybridisiert. Dieses Blockieren der konstanten Bereiche sollte zum einen die

DISKUSSION

homogene Faltung der Nukleotide gewährleisten und zum anderen Interaktionen der Primerregionen mit den Target-Molekülen verhindern. Es wurden bereits Aptamere selektiert, in deren Bindung diese Regionen involviert waren.²⁰⁷ Dieses Verhalten kann bei einer SELEX von Nachteil sein, da alle sich im Pool befindenden DNAs diese Bereiche aufweisen, was den Selektionsprozess verhindert. Die rekombinanten Proteine wurden über deren Hexa-His-Tag auf den mit Cobalt beschichteten *Beads* (Abb. 74; Abb. 75) immobilisiert. Dadurch wurden keine Proteinseitenketten in die Immobilisierung involviert, was die Wahrscheinlichkeit möglicher Strukturveränderungen des Targets minimierte.

N-SELEX

Die Ergebnisse des Diversitätsassays zeigten, dass der Selektionspool mit steigender Rundenzahl immer homogener wurde. Dies steht auch im Einklang mit der Anzahl an PCR-Zyklen, die benötigt wurden um ausreichende Mengen an DNA für die nachfolgende SELEX-Runde zu erhalten (Tab. 64; Abb. 49). In den letzten vier Runden blieb die Diversität des Pools gleich, was ein Hinweis auf eine Anreicherung sein kann. Nach der Sequenzierung des Pools nach Runde 12 konnten 32 verschiedene DNA-Moleküle identifiziert werden. Nach dem Vergleich der Sequenzen ergab sich anhand der resultierenden Consensus-Sequenz ein Verwandtschaftsgrad von 55%. Dabei kamen drei DNA-Sequenzen wiederholt vor. Eine der Sequenzen wurde zweimal gefunden, obwohl sie eine abweichende Länge aufwies. Letzteres kann entweder durch Polymerase-Fehler hervorgerufen worden sein oder auf die Ausbildung bestimmter Strukturen innerhalb des Moleküls zurückzuführen sein.

```
1 170_N_14 ACA AC-CTTCTCC GGCTCTTCTC TTCTCG---T CCGTCTCCTG TCTCTCCCGC CCCTCGA 76
170_N_1 ATCCAGAGTG ACGCAGCAC CTCTCCTCTC CACTCTGATC CCCGCCCTC TCgCTATC G GACACGGTGG CTTAGT
Consensus .....aca AC.CagCaCC cgCTCCTCTC caCTCg...c CCCgCcCCTc TCgCTAcCgc caCaCGa... ..
```

Abb. 62: Alignment von zwei DNA-Molekülen nach der Selektion für Embp170. Hierbei wurde exemplarisch die Sequenz der DNA mit der Nummer 1 mit der Sequenz der beiden DNA-Moleküle, die deutlich längere randomisierte Bereiche aufwiesen, verglichen. Das Oligonukleotid Nummer 1 wurde hier samt den Primerregionen (grau hinterlegt) mit dem randomisierten Bereich des längeren Oligos (170_N_14) verglichen.

Dabei liefert der Vergleich zweier Oligonukleotide Hinweise darauf, dass diese trotz des Längenunterschieds miteinander verwandt sind (Abb. 62). Es kann somit sein, dass die Nukleinsäure 170_N_1 aus zwei anderen DNA-Molekülen aus dem Selektionspool entstand. Dies kann durch falsches Ablesen von Nukleinsäuren durch

DISKUSSION

die Polymerase entstehen, wenn z. B. diese miteinander interagieren und spezielle Strukturen ausbilden. Dies kann passieren, wenn die Moleküle multimere Strukturen ausbilden oder an manchen Stellen miteinander hybridisieren und von der Polymerase als ein einziges Molekül erkannt werden.

Von den 32 identifizierten DNA-Molekülen sind acht (24%) fähig GQ-Strukturen auszubilden. Bei einem der Oligonukleotide könnten sich zwei GQs mit der gleichen Wahrscheinlichkeit ausbilden. Da die GQs überlappen, steht deren Ausbildung in Konkurrenz zueinander. Dabei stellt sich die Frage, welcher der beiden bevorzugt ausgebildet wird und welche Faktoren sich zu Gunsten der Ausbildung einer der beiden Strukturen auswirken.

Bei dem ersten gefundenen Motiv (Abb. 50) waren die ersten fünf Nukleotide relativ variabel. Deswegen wäre es interessant, den Einfluss unterschiedlicher Oligonukleotide in dieser Region auf die Affinität zum Target zu untersuchen. Auch die DNA-Moleküle, die gleichzeitig zwei der Motive in ihrer Sequenz tragen, könnten in Bezug auf die Bindung an Embp170 von Bedeutung sein.

C-SELEX

Die Ergebnisse des Diversitätsassays (Abb. 47) stehen im Einklang mit der Anzahl an benötigten PCR-Zyklen. Nach der 12. Runde wurden die Sequenzen von 30 DNA-Molekülen analysiert. Dabei kamen zwei der DNA-Sequenzen wiederholt vor (Tab. 76). Die Oligonukleotide nach der letzten Runde zeigten einen hohen Verwandtschaftsgrad von 45%. Diese Sequenzähnlichkeit spiegelt sich in den Ergebnissen der Motiv-Suche mit Hilfe von MEME wieder.¹⁶³ Die drei gefundenen Sequenz-Motive (Abb. 48) kamen in den Oligonukleotiden jeweils einzeln vor (Tab. 48). Allerdings ist eines der Motive (Motiv 1) stark konserviert und die MEME-Software schlägt nur bei vier der 40 nt des randomisierten Bereiches ein alternatives Nukleotid vor. Es wurde bei sechs der Oligonukleotide gefunden. Auch das zweite Motiv erscheint aufgrund seiner GT-Wiederholungen stark konserviert und ähnelt der Consensus-Sequenz. Bei 19 DNA-Molekülen (63%) können GQs ausgebildet werden. Bei zwei davon können sich gleichzeitig zwei dieser Strukturen formen (DNAs: 9C und 21C).

DISKUSSION

Vergleich der beiden SELEX-Methoden

Da die Anzahl benötigter PCR-Zyklen, um eine ausreichende Menge an DNA-Molekülen für nachfolgenden SELEX-Runden zu erhalten, bei den beiden Selektionsmethoden ähnlich war, lässt sich folgern, dass trotz des zusätzlichen Blockierens der Primerregionen, die Stringenz der beiden SELEX-Methoden vergleichbar war. Auch die Ergebnisse der Diversitätsassays zeigen sehr ähnliche Tendenzen (Abb. 47 und Abb. 49). Dabei zeigte sich die größte Diversitätsabnahme bis Runde 5. Nach dieser Runde blieben die Pools bezüglich der Streuung ihrer Schmelztemperaturen größtenteils konstant.

Zwei in der Sequenz identische Moleküle wurden jeweils sowohl nach der N- als auch nach der C-SELEX gefunden. Dass dieses Molekül sich in beiden Selektionen befand, kann dies ein Hinweis auf seine Affinität gegenüber dem Target trotz unterschiedlicher Bedingungen sein. Diese Nukleinsäure zeigte außerdem nach der N-SELEX die höchste Stabilität. Die Stabilität von Aptameren ist von besonderer Bedeutung, um eine konstante Wechselwirkung mit dem Target zu gewährleisten.

Der Vergleich der beiden SELEX-Methoden zeigt, dass durch das Blockieren der Primersequenzen verglichen mit einer konventionellen SELEX, die Anreicherung von unterschiedlichen DNA-Molekülen aus demselben Ausgangspool begünstigt war.

Bei dem Vergleich der Sequenzmotive nach beiden Selektionen wurde ein sehr ähnliches Motiv ermittelt (Motiv 1 und 3 des C-SELEX-Pools und Motiv 1 N-SELEX-Pools). Dieses ist CT-reich und scheint bei dem Pool nach der C-SELEX konservierter zu sein. Die Bindungsstudien könnten Hinweise dafür liefern, inwiefern der Gehalt an Cytosin und Thymin für die Bindung an das Embp170-Molekül verantwortlich ist.

Der direkte Vergleich der Methoden liefert Hinweise darauf, dass die C-SELEX dem DNA-Pool eine bessere Qualität verleiht, was durch folgende Indizien und Parameter der DNA-Moleküle zum Ausdruck kam. Während nach der C-SELEX 17% der Oligonukleotide eine abweichende Länge des randomisierten Bereiches aufwiesen, belief sich deren Anteil nach der N-SELEX auf 33%. Außerdem lieferte die C-SELEX-Methode bevorzugt Nukleinsäuren mit dem Potenzial zur Bildung von GQs. Im Gegensatz dazu wurden nach der N-SELEX-Methode 40% weniger Oligonukleotide erhalten, die GQs ausbilden könnten. Verglichen mit den Molekülen

DISKUSSION

nach der N-SELEX bildeten die Oligonukleotide nach der C-SELEX bei der Mfold-Vorhersage sowohl bei RT als auch bei 37 °C stabilere 2D-Strukturen.

Bei dem Pool nach der letzten C-SELEX-Runde ergab sich ein Verwandtschaftsgrad von 45% für die enthaltenen Sequenzen. Für die N-SELEX lag dieser Verwandtschaftsgrad bei 55%. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass die DNA-Moleküle hier stärker an bestimmten, untereinander verwandten Sequenzen angereichert waren, als es nach der Primer-*Blocking*-Methode der Fall war.

Außerdem wurden auch nach der SELEX für das Embp125 die gleichen DNA-Moleküle wie in diesen beiden Selektionen gefunden (125_171 und _177; Affinität von 11%). Da die Selektionen für Embp170 und Embp125 zu unterschiedlichen Zeitpunkten und aus zwei unterschiedlichen Startbibliotheken durchgeführt wurden und außerdem auch unterschiedliche magnetische *Beads* verwendet worden sind, ist es möglich, dass diese DNAs an beide Protein-Fragmente binden können. Ein mögliches Target könnten hierbei die in beiden Protein-Fragmenten vorkommenden sogenannten FIVAR-Module sein.

Die Affinität, der in den drei Selektionen gefundenen potenziellen Bindern gegenüber Embp125, wurde in radioaktiven *Gel-Shift* Assays getestet (Tab. 75). 11% der Nukleinsäuren zeigten dabei eine Bindung an das Target. Allerdings lag das Target bei diesem Bindungstest im Gegensatz zur SELEX nicht immobilisiert vor, was die Wechselwirkungen verändert haben könnte. Ein Vergleich der Affinität dieses Moleküls mit den beiden Embp-Fragmenten könnte zeigen, ob es besser mit den FIVAR-Domänen alleine als mit dem Gemisch aus FIVAR- und GA-Modulen interagiert.

6.3 Hochdurchsatz-Sequenzierung als SELEX-Werkzeug

Die NGS-Analyse mittels der Brückensynthese kann den Erfolg der SELEX-Methode vereinfachen und verkürzen. Der größte Vorteil im Vergleich zu der konventionellen Sequenzierung nach Sanger ist, dass mittels NGS viel mehr Sequenzen in kürzester Zeit ermittelt werden können.

Vorbereitend wurden die Pools in zwei Amplifikationsschritten so modifiziert, dass sie am Ende um die gleiche Nukleotidabfolge verlängert wurden, die sonst mit dem TruSeq-Illumina-Kit eingeführt werden. Die zusätzlichen DNA-Sequenzen sind für die NGS-Analyse erforderlich und auch mit dem HiSeq-Gerät kompatibel. Der Erfolg der

DISKUSSION

DNA-Pool-Modifikationen wurde mittels Bioanalyser und PAGE (Abb. 51 und Abb. 52) kontrolliert. Dabei konnten die Produkte der gewünschten Länge an beiden Synthesestufen für alle Pools gefunden werden.

Nach der Auswertung der NGS-Daten konnten insgesamt 2685 Datensätze generiert werden. Somit wurden hier 13 Mal mehr Sequenzen (209) ermittelt als mit der Sanger-Methode (Tab. 51).

Trotz des Vorhandenseins von Oligonukleotiden der gewünschten Länge in allen Pools und deren ausreichender Konzentration für die NGS-Analyse, konnten nur für 12 der 20 DNA-Pools Daten ermittelt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass manche der Pools für die Brückensynthese, welche bei der Illumina Methode genutzt wird, unter den gewählten Bedingungen nicht geeignet waren. Auch die Lagerung der Pools, welche erst vier Monate nach der Synthese sequenziert wurden, könnte einen negativen Einfluss auf die Sequenzierung gehabt haben. Da die Messung extern durchgeführt wurde, konnten diese Faktoren jedoch nicht weiter beeinflusst werden. Sowohl die Herstellung der Pools als auch die Qualitätskontrolle der Produkte lieferten dagegen stets zufriedenstellende Resultate und es konnten hierbei keine Fehler gefunden werden (Abb. 51 und Abb. 52). Lediglich die zwei nachfolgenden PCR-Schritte hätten in Nukleotideinbaufehlern resultieren können. Nichtsdestoweniger konnten für viele der Pools Sequenzdaten generiert werden, von denen sich auch einige in den Daten der konventionellen Sequenzierung wiederfanden (Abb. 88 und Abb. 91).

NGS Analyse des DNA-Pools nach der Selektion von CD24-spezifischen Molekülen

Bei der Analyse der Selektionspools aus der SELEX für CD24-bindende Moleküle zeigte sich, dass das Aptamer CD24A_2 bereits in der Runde 4 hätte identifiziert werden können. Es wäre interessant, die Affinität eines weiteren DNA-Moleküls zu untersuchen, welches nach der letzten SELEX-Runde mittels der Sanger-Sequenzierungsmethode und im Pool 10 nach der NGS gefunden wurde. Allerdings kam dies nur einmal vor, was wahrscheinlich mit der niedrigen Ausbeute des NGS-Pools zu erklären ist. Somit konnten anhand dieser Daten noch keine Rückschlüsse auf die mögliche Affinität der beiden DNA-Moleküle gezogen werden. Dabei zeigte der Vergleich, dass die Moleküle aus den drei Sequenzierungspools (NGS R4 und R10

DISKUSSION

und Sanger R12) sich sehr ähnlich und ebenfalls A-reich waren. Auch dies ist wieder ein Hinweis dafür, dass die größte Anreicherung bereits in den ersten Runden stattfand und eine SELEX in vielen Fällen früher beendet werden könnte.

NGS Analyse des DNA-Pools nach der SELEX für Embp125-Molekül

Unter den 226 DNA-Molekülen nach der NGS und den 37, die nach der Sequenzierungsmethode nach Sanger erhalten wurden, konnten drei wiederholt auftretende DNA-Sequenzen (Tab. 52) gefunden werden. Dabei wiesen die ersten Tests bereits darauf hin, dass diese Moleküle mit dem Target interagieren könnten (2-25% Bindung; Tab. 75). Somit ist es möglich, die SELEX-Methode durch das Monitoring mit NGS-Analyse deutlich zu verkürzen, indem die DNA-Moleküle getestet würden, die mit steigender Rundenanzahl überrepräsentiert vorkommen. Das könnte einen schnelleren und effizienteren Selektionsprozess unterstützen.

NGS-Analyse der DNA-Pools, die nach der Selektion für Embp170-spezifische Moleküle erhalten wurden

Auch die resultierenden Sequenzmotive der DNA-Moleküle aus den NGS-Pools (Abb. 57) waren den Motiven ähnlich, die aus einem Pool aus mehreren in der Sequenz verschiedenen Molekülen, die nach der Sanger-Sequenzierungsmethode gefunden wurden, stammten. Dabei zeigte sich, dass die Anreicherung dieser Motive bereits im Pool nach Runde 5 stattfand. Folglich kann ein Monitoring des SELEX-Prozesses mittels NGS deutlich früher zur Beendigung des Selektionsprozesses führen.

Es zeigte sich, dass während der Selektion für das Embp170 Fragment unabhängig von der SELEX-Methode CT-reiche DNA-Moleküle angereichert wurden. Allerdings deuten die Ergebnisse des NGS darauf hin, dass der Verwandtschaftsgrad der DNA-Moleküle in den Pools untereinander schneller in der N-SELEX (2.5- 23- 20%) als in der C-SELEX (2.5- 5- 25%) anstieg. Jedoch bezieht sich der Verwandtschaftsgrad auf die mit allen DNA-Molekülen generierte Consensus-Sequenz. Diese kann durch das Vorhandensein von Ausreißern oder variablen DNA-Positionen verfälscht werden und somit nur als Anhaltspunkt bzw. Näherung betrachtet werden. Die Motivsuche zeigte hierbei, dass die Motive nach der C-SELEX länger und konservierter waren als nach

DISKUSSION

der N-SELEX (Abb. 89 und Abb. 90). Dies spricht für einen besseren Selektionsvorgang durch das Blockieren der Primerregionen.

Der Vergleich der DNA-Moleküle aus den beiden Selektionen für Embp170 affine Nukleinsäuren zeigte unabhängig vom Selektionsverfahren eine Anreicherung von zwei DNA-Molekülen. Deren Sequenzen unterschieden sich zwar voneinander, wiesen aber stark konservierte Motive auf, die für die Bindung an Embp170 verantwortlich sein könnten (Abb. 54; in rot dargestellt).

Im Folgenden wurden nur noch solche DNA-Moleküle analysiert, die nicht nur innerhalb eines NGS-Pools wiederholt vorkamen, sondern gleichzeitig auch mehrmals in Pools aus mehreren Sequenzen von verschiedenen DNA-Molekülen nach der Sanger-Methode gefunden wurden. Diese DNA-Moleküle wurden nur für die beiden Selektionsverfahren von Aptameren für das Embp170 identifiziert. Es wurden acht Moleküle nach der Selektion gefunden, bei denen die Primerregionen während der Inkubation mit dem Target blockiert worden waren (C-SELEX). Diese DNA-Moleküle waren untereinander sehr ähnlich und zeigten eine Consensus-Sequenz aus 31 Nukleobasen, welche sehr CT-reich war. Das ergab einen Verwandtschaftsgrad von 78%. Hinzu kam, dass zehn der Nukleobasen in allen acht Nukleinsäuren (Abb. 56) konserviert vorkamen. Diese Oligonukleotide können als vielversprechende Kandidaten für potenzielle Aptamere angesehen werden und sollten in Zukunft auf ihre Targetbindung hin untersucht werden. Zwei der DNA-Moleküle wurden auch nach der Sequenzierung des letzten Pools nach Sanger gefunden. Das spricht dafür, dass diese DNA-Moleküle in dem Selektionspool angereichert waren, was auf einen Selektionserfolg hindeutet.

Bei den DNA-Pools aus den SELEXes nach der konventionellen Methode für das Embp170-Molekül wurden 12 DNA-Moleküle gefunden, die wiederholt sowohl innerhalb einer als auch in mehreren Runden vorkamen. Diese Moleküle waren ebenfalls CT-reich. Der Verwandtschaftsgrad lag hier bei 63%. Auch die Anzahl konservierter Nukleobasen war hierbei geringer. Während es nach der C-SELEX zehn waren, konnten nach der N-SELEX nur drei ermittelt werden. Das zeigt, dass der C-SELEX-Pool homogenere DNA-Sequenzen aufwies als der N-SELEX-Pool.

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden erfolgreich Selektionen mit allen vier Targets durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass in allen Fällen Target-affine Pools selektiert werden konnten.

Standardmäßig werden bei der Selektion von Aptameren DNA-Pools mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Es ist denkbar, dass hierbei manche der DNA-Moleküle aufgrund ihrer physikalischen und thermodynamischen Eigenschaften weniger effizient vervielfältigt werden.

In diesem Zusammenhang wäre es daher interessant, eine Selektion mit dem gleichen Ausgangspool mittels einer unkonventionellen isothermalen Reaktion durchzuführen. Im Gegensatz zu der PCR werden hier die temperaturabhängigen durch enzymatische Schritte ersetzt.^{208,209} Als eine Methode steht hier z. B. die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation zur Verfügung. Dabei läuft die Vervielfältigung bei einer konstanten Temperatur von 25-45 °C ab.^{208,210} Die Verwendung physiologischer Temperaturen kann während der Amplifikation insbesondere bei einer Zell-SELEX von Vorteil sein, um das DNA-Pool-Eluat nicht zusätzlich mit der Zell-DNA zu verunreinigen. Ein weiterer Vorteil gegenüber der konventionellen Vervielfältigungs-Methode ist die geringere benötigte Zeit, da es zwischen den Zyklen keine Heiz- und Kühlphasen gibt. Daher kann die isothermale Amplifikation in einem einfachen Heizblock anstelle eines PCR-Cyclers erfolgen. Desweiteren stellt die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten während der PCR ein großes Problem dar.¹⁵⁷ Für die isothermale Methode wurden bereits mehrere Polymerasen (z. B. Bst 2.0 und Bst 2.0 Warmstart) erfolgreich getestet, die eine konsistente und akkurate Vervielfältigung der DNA gewährleisten.²⁰⁹ Das kann zu einer effizienteren SELEX führen. Durch den Vergleich der Diversitätsassays von DNA-Pools, welche mittels konventioneller bzw. isothermaler Methode erzeugt wurden, könnte so getestet werden, ob eine zusätzliche unerwünschte Selektion während der PCR erfolgte. Die darauffolgenden Bindungsstudien könnten über das Potenzial der dabei verlorenen Oligonukleotide Auskunft geben.

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit die strukturellen und sequenziellen Besonderheiten der Nukleinsäuren charakterisiert, die bei der Target-Wechselwirkung

AUSBLICK

eine Rolle spielen könnten. Weitere Studien wären noch notwendig, um zu zeigen, welche der Oligonukleotide und somit welche der identifizierten Motive für die stärkste Affinität zu den Targets verantwortlich sind. Hierzu könnte auch die während dieser Arbeit genutzte Durchflusszytometrie angewendet werden. Dabei sollten zunächst die SELEX-Bedingungen beibehalten werden, weil z. B. durch andere Pufferbestandteile auch die Affinität beeinflusst werden könnte.²¹¹

Desweiteren sollte analysiert werden, mit welcher Bindungstasche die erhaltenen hier beschriebenen Aptamere interagieren und welchen Einfluss diese Wechselwirkungen auf die Target-charakteristischen Signalkaskaden haben. Eine experimentelle Strukturaufklärung könnte die Antwort auf die Frage nach der Aptamer-Target-Bindungsstelle liefern. Hierfür könnte eine SAXS-Analyse möglicherweise erste Anhaltspunkte liefern. Alternativ könnte die Kryoelektronenmikroskopie verwendet werden, für welche ebenfalls eine Kristallisation nicht notwendig ist. Allerdings können hiermit zurzeit nur Moleküle analysiert werden, die eine Größe von 64 kDa überschreiten. Deswegen können Aptamere nur im Komplex mit deren Targets analysiert werden.²¹² Ein zusätzlicher Vergleich zwischen den Strukturen des Komplexes und der Einzelkomponenten könnte zeigen, ob diese Interaktion Veränderungen hervorrufen kann oder ob die beiden Moleküle bereits vor der Bindung strukturell determiniert sind. Von manchen Proteinen ist bekannt, dass sie sich z. B. durch einen sogenannten *induced fit* ihren Bindungspartnern anpassen.²¹³ Theoretisch sollten Aptamere zwar aufgrund ihrer definierten initialen 3D-Struktur mit dem Target wechselwirken, aber viele Ergebnisse belegen, dass der genannte *induced fit* häufig unter dem Einfluss des Targets möglich sein kann.²¹⁴

In dieser Arbeit wurden algorithmisch die 2D- und 3D-Strukturen für die Aptamere CD24A_2 und _5 vorhergesagt. Um zu testen, wie verlässlich diese Algorithmen funktionieren, wäre es von Bedeutung zu analysieren, wie sehr sie sich von den realen Strukturen unterscheiden. Bei dem CT916-Aptamer wurde kürzlich gezeigt, dass die 3D-Strukturvorhersage mit der SAXS-Analyse übereinstimmte.¹⁹⁵

Die Targetproteine, die in dieser Arbeit behandelt wurden, sind bislang unzureichend charakterisiert. Im Falle der hier selektierten CD24-Aptamere sollte ermittelt werden, ob diese ebenso wie die CD24-Antikörper in der Lage sind, die Krebsprogression zu unterdrücken.⁷⁹ Zusätzlich wurde gezeigt, dass jeder der vier untersuchten IgGs in der

AUSBLICK

Lage war, das Tumorwachstum zu inhibieren. Das passierte obwohl die Antikörper unterschiedliche Epitope auf dem CD24-Molekül banden. Somit kann ein analoges Verhalten für die Aptamere vermutet werden. Hierzu könnten Zellkulturstudien mit diversen Krebszelllinien durchgeführt werden und unter anderem in Erfahrung gebracht werden, ob durch diese Bindung das Zellwachstum gehemmt wird.

Vorherige Studien, welche die Interaktion zwischen HT-29-Zellen und P-Selektin untersuchten, lieferten inkonsistente Ergebnisse bzgl. der Wechselwirkung zwischen den Zellen und dem Protein.^{103,215} Zwar wurden Hinweise auf die entscheidende Rolle des CD24-Moleküls bei dieser Bindung gefunden, allerdings könnte unter Zuhilfenahme des CD24A_2-Aptamers diese Interaktion z. B. in einem dynamischen Zellassay unter annähernd physiologischen Bedingungen genauer untersucht werden. Es wurde in den hier beschriebenen Experimenten gezeigt, dass das Aptamer CD24A_2 nicht um die Bindungsstelle mit dem ML-5 Antikörper konkurriert. Das legt die Vermutung nahe, dass das Aptamer mit dem glykosylierten Teil des Moleküls wechselwirken könnte. Dies könnte in einer Studie, in der der Glykosylierungsmechanismus der Zelle unterdrückt wird, aufgeklärt werden. Um den Einfluss der Zucker-Funktionen auf die Interaktion zwischen dem Aptamer und CD24 zu verifizieren, könnten Inhibitoren von Glykosyltransferasen und Glykosidasen verwendet werden.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit wäre die Verwendung der CD24-Aptamere in einem diagnostischen Test. Hier könnten die zu untersuchenden Zellen mit einer Verdünnungsreihe des Aptamers inkubiert werden. Nach einer Amplifikation der gebundenen Aptamere könnte die CD24-Produktion mittels qPCR quantifiziert werden. Dieser Test könnte sowohl für die Untersuchung der Krankheitsprognose als auch bei der Verfolgung der postoperativen Heilung helfen. Damit könnten unter anderem Rezidive schnell und zuverlässig nachgewiesen werden.

Bei der Entwicklung wirksamer Krebsmedikamente stellt deren Toxizität die größte Limitation dar. Die selektierten Aptamere könnten helfen, die Spezifität solcher Medikamente zu steigern, indem sie die zellgiftigen Medikamente binden und direkt an den Wirkungsort (CD24-überpräsentierende Krebszellen) bringen. Da sich bestätigt hat, dass das CD24A_2-Aptamer internalisiert werden kann, könnten somit solche Wirkstoffe in die Zelle mit eingeschleust werden. Ein solcher Ansatz wurde z. B. von

AUSBLICK

Froesch *et al.* genutzt, um mittels Antikörperbindung das zytotoxische Doxorubicin in Lungenkrebszellen zu befördern und dadurch die Krankheit spezifisch zu unterbinden. Ein ähnlicher Ansatz gelang mit internalisierten IL-6R-Aptameren.²¹⁶ Im Vergleich zur Behandlung alleine mit freiem Doxorubicin zeigten die CD24-Konjugate eine 100fach höhere Selektivität.²⁰⁶

Außerdem könnten diese Aptamere *per se* als alternative Wirkstoffe fungieren. Voraussetzung dafür wäre, dass die Nukleinsäuren die Wechselwirkungen zwischen dem Targetprotein und einem in der Tumorprogression beteiligten Liganden unterbinden.

Eine post-selektive Modifikation des CD24A_2-Aptamers könnte zur Steigerung seiner Serum-Stabilität führen. Um die renale Ausscheidung des 23.48 kDa großen Aptamers zu erschweren, könnte die Nukleinsäure mit Polyethylenglykol derivatisiert werden.

Das Einbringen von gewünschten Substituenten über die *Click*-Chemie könnte nicht nur in Aptameren resultieren, die eine höhere Beständigkeit gegenüber DNasen aufweisen, sondern auch in einer höheren Affinität. Bei dem CD24A_2-Aptamer könnte z. B. zunächst eine Zucker-Funktion eingeführt werden. In dem Fall, dass dieser Substituent in der Steigerung der Affinität resultiert, könnte diese Funktion in einem nächsten Schritt weiter multipliziert werden.

Sollte CD24A_2 sowohl die Signalkaskade als auch die Tumorbildung inhibieren und gleichzeitig eine entsprechende Stabilität aufweisen, könnten weiterführende Studien *in vivo* mit diesem Aptamer durchgeführt werden.

8 Sicherheit

8.1 Entsorgung

Die Chemikalien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden entsprechend ihrer H- und P-Sätze (8.3) gehandhabt und gemäß der Gefahrgutverordnung entsorgt. Lösungsmittel und kontaminierte Betriebsmittel wurden in entsprechend gekennzeichneten Behältern gesammelt und Ethidiumbromid sowie SYBR-Gold-Abfälle getrennt entsorgt.

Mit gentechnisch veränderten Organismen kontaminierter Abfall wurde gemäß dem Gentechnikgesetz vor der Entsorgung unter einem Druck von 5 bar für 20 Min. bei 121 °C autoklaviert.

8.2 KMR-Stoffe

Tab. 57: Die Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe.

CAS-Nummer	IUPAC-Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
1239-45-8	3.8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid	1%ige wässrige Lösung zum Anfärben der PAA-Gele	M: 2
68-12-2	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von Dot-Blots	R _D : 1B
163795-75-3	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation	Für die qPCR Messung	
79-06-1	Prop-2-enamid	20%ige wässrige Lösung zur Polymerisation der Gele	K: 1B, M: 1B, R _F : 2
56-65-5	$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Radioaktivmarkierung der Nukleinsäuren	
56-65-5	$\alpha^{32}\text{P}$ -dTTP	Radioaktivmarkierung der Nukleinsäuren	

SICHERHEIT

8.3 Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS

Tab. 58: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS.

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid		301-312-315-317-319-332-340-350-361f-372	201-280-302+352-305+ 351 +338
Ampicillin		315-317-319-334-335	261-280-305+351+338-342-311
APS		272-302-315-317-319-334-335	280-305+351+338-302+352-304+341-342+311
Bisacrylamid		302	
DTT		302-315-319	302+352-305+351+338
EDTA		319	305-351-338
Ethanol		225	210
Ethidiumbromid		332-341	281-308+313

SICHERHEIT

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Formaldehyd		301-311-314-317-351	301+310-303+361+353-305+351+338-361-405-505
Formamid		360D	308+313
Imidazol		302-314-361d	280-301+330+331-305+ 351+338
Isopropanol		225-319-326	210-233-305+351+338
NaOH		314-290	280-301+330+331-305+ 351+338
Salzsäure		290-314-335	280-301+330+331-305+351+338
SDS		228-311-302-335-315- 319	210-280-304+340-305+351+338-309+310
TEMED		225-302-314-332	210-233-280-301+330+331-305+351+338

SICHERHEIT

TRIS		315-319-335	261-305+351+338
Propidiumiodid		315-319-335	261-305+351+338
DMSO	keine		

9 Literatur

1. Nimjee, S. M., Rusconi, C. P. & Sullenger, B. A. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* **56**, 555–83 (2005).
2. Doudna, J. A., Cech, T. R. & Sullenger, B. A. Selection of an RNA molecule that mimics a major autoantigenic epitope of human insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 2355–2359 (1995).
3. Eaton, B. E., Gold, L. & Zichi, D. A. Let's get specific: the relationship between specificity and affinity. *Chem. Biol.* **2**, 633–638 (1995).
4. Long, S. B., Long, M. B., White, R. R. & Sullenger, B. A. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. 2504–2512 (2008).
5. Baillargeon, K. R. *et al.* Precipitation SELEX: identification of DNA aptamers for calcium phosphate materials synthesis. *Chem. Commun.* **53**, 1092–1095 (2017).
6. Frohnmeyer, E., Frisch, F., Falke, S., Betzel, C. & Fischer, M. Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELISA. *J. Biotechnol.* **269**, 35–42 (2018).
7. Betat, H. *et al.* Aptamers that recognize the lipid moiety of the antibiotic moenomycin A. *Biol. Chem.* **384**, 1497–1500 (2003).
8. Shangguan, D. *et al.* Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11838–43 (2006).
9. Zamay, G. S. *et al.* DNA Aptamers for the Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **6**, 150–162 (2017).
10. Becker, R. C., Oney, S., Becker, K. C. D., Rusconi, C. P. & Sullenger, B. Nucleic acid aptamers and their complimentary antidotes: Entering an era of antithrombotic pharmacobiologic therapy. *Hamostaseologie* **27**, 378–382 (2007).
11. Oney, S. *et al.* Development of universal antidotes to control aptamer activity Sabah. *Nat Med.* **15**, 1224–1228 (2010).
12. Rusconi, C. P. *et al.* RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **419**, 90–94 (2002).
13. Rusconi, C. P. *et al.* Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1423–1428 (2004).
14. Winkler, W. C. & Breaker, R. R. Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBioChem* **4**, 1024–1032 (2003).
15. Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A. & Breaker, R. R. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**, 281–286

LITERATUR

- (2004).
16. Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. Riboswitches: The oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* **20**, 44–50 (2004).
 17. Tang, J. & Breaker, R. R. Rational design of allosteric ribozymes. *Chem. Biol.* **4**, 453–459 (1997).
 18. Vinkenburg, J. L., Karnowski, N. & Famulok, M. Aptamers for allosteric regulation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 519–527 (2011).
 19. Fischer, C. *et al.* Food Sensing: Aptamer-Based Trapping of *Bacillus cereus* Spores with Specific Detection via Real Time PCR in Milk. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8050–8057 (2015).
 20. Ng, E. W. M. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123–32 (2006).
 21. Wang, C., Zhang, L. & Shen, X. Development of a nucleic acid lateral flow strip for detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **32**, 59–38 (2013).
 22. Krylova, S. M. *et al.* DNA aptamers for as analytical tools for the quantitative analysis of DNA-dealkylating enzymes. *Anal. Biochem.* **414**, 261–265 (2011).
 23. Du, Y. L., Mo, L. T., Yi, Y. S., Qiu, L. P. & Tan, W. H. Aptamers from Cell-based Selection for Bioanalysis and Bioimaging. *Chinese J. Anal. Chem.* **45**, 1757–1765 (2017).
 24. Kwon, Y. S., Ahmad Raston, N. H. & Gu, M. B. An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity. *Chem. Commun.* **50**, 40–42 (2014).
 25. Vavalle, J. P. *et al.* A phase 1 ascending dose study of a subcutaneously administered factor IXa inhibitor and its active control agent. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1303–1311 (2012).
 26. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711–723 (2010).
 27. Molckovsky, A. & Siu, L. L. First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: Highlights of the 2008 American Society of Clinical Oncology meeting. *J. Hematol. Oncol.* **1**, 1–9 (2008).
 28. White, R. R., Sullenger, B. A. & Rusconi, C. P. Developing aptamers into therapeutics. *J. Clin. Invest.* **106**, 929–934 (2000).
 29. Pastor, F. *et al.* CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2**, (2013).
 30. Mor-Vaknin, N. *et al.* DEK-targeting DNA aptamers as therapeutics for

LITERATUR

- inflammatory arthritis. *Nat. Commun.* **8**, 1–13 (2017).
31. Bates, P. J., Laber, D. a, Miller, D. M., Thomas, S. D. & Trent, J. O. Discovery and Development of the G-rich Oligonucleotide AS1411 as a Novel Treatment for Cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 151–164 (2010).
 32. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. a, Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564–566 (1992).
 33. Wolter, O. & Mayer, G. Aptamers as Valuable Molecular Tools in Neurosciences. *J. Neurosci.* **37**, 2517–2523 (2017).
 34. Yang, M. *et al.* Developing aptamer probes for acute myelogenous leukemia detection and surface protein biomarker discovery. *J. Hematol. Oncol.* **7**, 5 (2014).
 35. Coenen-Stass, A. M. L. *et al.* Identification of novel, therapy-responsive protein biomarkers in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy by aptamer-based serum proteomics. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
 36. Gilboa, E., McNamara, J. & Pastor, F. Use of oligonucleotide aptamer ligands to modulate the function of immune receptors. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1054–1062 (2013).
 37. Morris, K. N., Jensen, K. B., Julin, C. M., Weil, M. & Gold, L. High affinity ligands from in vitro selection : Complex targets. *RNA* **95**, 2902–2907 (1998).
 38. Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M. & Schluesener, H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J. Biol. Chem.* **276**, 16464–16468 (2001).
 39. Daniels, D. A., Chen, H., Hicke, B. J., Swiderek, K. M. & Gold, L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15416–15421 (2003).
 40. Wang, C. *et al.* Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: Subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J. Biotechnol.* **102**, 15–22 (2003).
 41. Luo, J., Isaacs, W. B., Trent, J. M. & Duggan, D. J. Looking Beyond Morphology: Cancer Gene Expression Profiling Using DNA Microarrays. *Cancer Invest.* **21**, 937–949 (2003).
 42. Ohuchi, S. Cell-SELEX Technology. *Biores. Open Access* **1**, 265–272 (2012).
 43. Ellington, A. & Szostak, J. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850–852 (1992).
 44. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510

LITERATUR

- (1990).
45. Mullis, K. *et al.* Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **263–273**, 1565 (1986).
 46. Langner, J. & Klussmann, S. PCR primers containing stop codons reduce the number of false-negatives during blue-white screening. *Biotechniques* **34**, 950–954 (2003).
 47. Tolle, F., Rosenthal, M., Pfeiffer, F. & Mayer, G. Click Reaction on Solid Phase Enables High Fidelity Synthesis of Nucleobase-Modified DNA. *Bioconjug. Chem.* **27**, 500–503 (2016).
 48. Hoinka, J., Zotenko, E., Friedman, A., Sauna, Z. E. & Przytycka, T. M. Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. *Bioinformatics* **28**, 215–223 (2012).
 49. Gijs, M. *et al.* Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer. *Pharmaceuticals* **9**, 15–19 (2016).
 50. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467 (1977).
 51. Cho, M. *et al.* Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15373–15378 (2010).
 52. Berezhnoy, A. *et al.* Isolation and optimization of murine IL-10 receptor blocking oligonucleotide aptamers using high-throughput sequencing. *Mol. Ther.* **20**, 1242–1250 (2012).
 53. Blind, M. & Blank, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **4**, e223 (2015).
 54. Bentley, D. R. *et al.* Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. *Nature* **456**, 53–59 (2009).
 55. illumina. Illumina Sequencing by Synthesis. (2016). Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>. (Accessed: 20th August 2018)
 56. Guo, J. *et al.* Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9145–9150 (2008).
 57. Poolsup, S. & Kim, C. Y. Therapeutic applications of synthetic nucleic acid aptamers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **48**, 180–186 (2017).
 58. Engel, P. *et al.* CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology: Table I. *J. Immunol.* **195**, 4555–4563 (2015).

LITERATUR

59. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–218 (2016).
60. Hahn, U. SDA and IDA - Two aptamers to inhibit cancer cell adhesion. *Biochimie* 1–7 (2017). doi:10.1016/j.biochi.2017.10.018
61. Berg, K. IDA – ein Integrin-spezifisches DNA-Aptamer. (Universität Hamburg, 2016).
62. Berg, K., Lange, T., Mittelberger, F., Schumacher, U. & Hahn, U. Selection and Characterization of an $\alpha 6\beta 4$ Integrin blocking DNA Aptamer. *Mol. Ther. Acids* **5**, e294 (2016).
63. Faryammanesh, R. *et al.* SDA, a DNA aptamer inhibiting E- And P-Selectin mediated adhesion of cancer and leukemia cells, the first and pivotal step in transendothelial migration during metastasis formation. *PLoS One* **9**, (2014).
64. Fischer, G. F., Majdic, O. & Knapp, W. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol* 1990; **144**, 638–641 (1990).
65. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
66. NCBI. CD24 molecule. (2018). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100133941>.
67. UniProt. CD24_MOUSE. (2018). Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/P24807>.
68. Kay, R., Rosten, P. M. & Humphries, R. K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. **147**, 1412–1416 (1991).
69. Nedelec, J. *et al.* Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. *Eur. J. Biochem.* **203**, 433–442 (1992).
70. Kadmon, G. *et al.* Evidence for Cis Interaction and Cooperative Signalling by the Heat-stable Antigen Nectadrin (murine CD24) and the Cell Adhesion Molecule L1 in Neurons. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 993–1004 (1995).
71. Wenger, R. H., Bose, R., Kohler, G. & Nielsen, P. J. The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen. *Eur. J. Immunol* **21**, 1039–1046 (1991).
72. Kleene, R., Yang, H., Kutsche, M. & Schachner, M. The Neural Recognition Molecule L1 is a Sialic Acid-binding Lectin for CD24, Which Induces Promotion and Inhibition of Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **276**, 21656–21663 (2001).
73. Aigner, S. *et al.* CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* **89**, 3385–95 (1997).

LITERATUR

74. Suzuki, T., Kiyokawa, N. & Taguchi, T. CD24 Induces Apoptosis in Human B Cells Via the Glycolipid-Enriched Membrane Domains/Rafts-Mediated Signaling System. *Eur. J. Immunol* **166**, 5567–5577 (2001).
75. Zhou, Q. *et al.* CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15041–15046 (2003).
76. Wang, L. *et al.* A Dinucleotide Deletion in CD24 Confers Protection against Autoimmune Diseases. *PLOS Genet.* **3**, 0508–0517 (2007).
77. Crocker, P. R., Paulson, J. C. & Varki, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 255–266 (2007).
78. Kristiansen, G. *et al.* Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab. Investig.* **90**, 1102–1116 (2010).
79. Sagiv, E. *et al.* CD24 Is a New Oncogene, Early at the Multistep Process of Colorectal Cancer Carcinogenesis. *Gastroenterology* **131**, 630–639 (2006).
80. American Cancer Society. (2017). Available at: <https://www.cancer.org/>.
81. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. (2013).
82. Senner, V. *et al.* CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 795–802 (1999).
83. Kristiansen, G. *et al.* CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. **9**, 4906–4913 (2003).
84. Kristiansen, G., Denkert, C., Dahl, E., Pilarsky, C. & Hauptmann, S. CD24 Is Expressed in Ovarian Cancer and Is a New Independent Prognostic Marker of Patient Survival. **161**, 1215–1221 (2002).
85. Darwish, N. S. *et al.* Prognostic Significance of CD24 Expression in Gastric Carcinom. *Cancer Res. Treat.* **36**, 298–302 (2004).
86. Smith, S. C. *et al.* The Metastasis-Associated Gene CD24 Is Regulated by Ral GTPase and Is a Mediator of Cell Proliferation and Survival in Human Cancer. 1917–1923 (2006).
87. Fukushima, T., Tezuka, T., Shimomura, T., Nakano, S. & Kataoka, H. Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. *J. Biol. Chem.* **282**, 18634–18644 (2007).
88. Weichert, W. *et al.* Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6574–6581 (2005).
89. Huang, L. R. & Hsu, H. C. Cloning and Expression of CD24 Gene in Human

LITERATUR

- Hepatocellular Carcinoma: A Potential Early Tumor Marker Gene Correlates with p53 Mutation and Tumor Differentiation. *Cancer Res.* **55**, 4717–4722 (1995).
90. Kristiansen, G. *et al.* CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* **88**, 231–236 (2003).
 91. Welsh, J. B. *et al.* Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1176–1181 (2001).
 92. Kristiansen, G. *et al.* CD24 Expression Is a Significant Predictor of PSA Relapse and Poor Prognosis in Low Grade or Organ Confined Prostate Cancer. **58**, 183–192 (2004).
 93. Overdevest, J. B. *et al.* CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Res.* **71**, 3802–3811 (2011).
 94. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* **67**, 1030–1037 (2007).
 95. Lee, J. H., Kim, S. H., Lee, E. S. & Kim, Y. S. CD24 overexpression in cancer development and progression: A meta-analysis. *Oncol. Rep.* **22**, 1149–1156 (2009).
 96. Lee, W. T. K. *et al.* CD24+ Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation Terence. *Cell Stem Cell* **9**, 50–63 (2011).
 97. Sagiv, E. *et al.* Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res.* **68**, 2803–2812 (2008).
 98. Sagiv, E., Kazanov, D. & Arber, N. CD24 plays an important role in the carcinogenesis process of the pancreas. **60**, 280–284 (2006).
 99. Fischer, A. *et al.* Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1451–1456 (1991).
 100. Benkerrou, M. *et al.* Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: prognostic factors and long-term outcome. *Blood* **92**, 3137–47 (1998).
 101. Aigner, S. *et al.* P-selectin mediates rolling of neutrophils and other leukocytes on activated endothelial cells and platelets through binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). Certain PSGL-1 negative tumor cell lines can bind P-selectin under static co. *FASEB J* **12**, 1241–1251 (1998).
 102. Shirure, V. S., Reynolds, N. M. & Burdick, M. M. Mac-2 Binding Protein Is a Novel E-Selectin Ligand Expressed by Breast Cancer Cells. *PLoS One* **7**, (2012).

LITERATUR

103. Baumann, P. *et al.* CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **65**, 10783–10793 (2005).
104. Sammar, M., Aigner, S. & Altevogt, P. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: Dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1337**, 287–294 (1997).
105. Abbassi, O., Kishimoto, T. K., McIntire, L. V., Anderson, D. C. & Smith, C. W. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Invest.* **92**, 2719–2730 (1993).
106. Rosette, C. *et al.* Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 943–950 (2005).
107. Staunton, D. E., Dustin, M. L., Erickson, H. P. & Springer, T. A. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**, 243–254 (1990).
108. Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L. & Springer, T. A. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**, 925–933 (1988).
109. Simmons, D., Makgoba, M. W. & Seed, B. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**, 624–627 (1988).
110. Dustin, M., Rothlein, R., Bhan, A., Dinarello, C. & Springer, T. Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245–254 (1986).
111. Lawson, C. & Wolf, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol. Reports* **61**, 22–32 (2009).
112. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689 (2007).
113. Springer, T. A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm Review. *Cell* **76**, 1–14 (2003).
114. Marlin, S. D. & Springer, T. A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**, 813–819 (1987).
115. Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C. & Anderson, D. C. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intracellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* **83**, 2008–2017 (1989).
116. Languino, L. R. *et al.* Regulation of leukocyte-endothelium interaction and

LITERATUR

- leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1505–1509 (1995).
117. Languino, L. R. *et al.* Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**, 1423–1434 (1993).
118. Greve, J. M. *et al.* The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839–847 (1989).
119. Marlin, S. D. *et al.* A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Lett. to Nat.* **344**, 70–72 (1990).
120. Staunton, D. E. *et al.* A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* **56**, 849–853 (1989).
121. Ockenhouse, C. *et al.* Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated plasmodium falciparum malaria: Differential adhesion of infected erythrocytes to cd36 and icam-1. *J. Infect. Dis.* **164**, 163–169 (1991).
122. Nik Kamarudin, N., Mohammed, N. & Mustaffa, K. Aptamer Technology: Adjunct Therapy for Malaria. *Biomedicines* **5**, 1 (2017).
123. Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C. & Ward, E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 1893–1907 (2010).
124. van Nagell, J. R. *et al.* Ultrasound and assessment of ovarian cancer risk. *Cancer* **37**, 408–14 (2013).
125. Liao, W. *et al.* Gene mutations in epidermal growth factor receptor signaling network and their association with survival in Chinese patients with metastatic colorectal cancers. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **293**, 1506–1511 (2010).
126. Corté, H., Manceau, G., Blons, H. & Laurent-Puig, P. MicroRNA and colorectal cancer. *Dig. Liver Dis.* **44**, 195–200 (2012).
127. Ding, D., Allman, B. L. & Salvi, R. Review: Ototoxic Characteristics of Platinum Antitumor Drugs. *Anat. Rec.* **295**, 1851–1867 (2012).
128. Li, X., Zhao, Q. & Qiu, L. Smart ligand: Aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *J. Control. Release* **171**, 152–162 (2013).
129. Li, D.-C. *et al.* Application of targeted drug delivery system in Chinese medicine. *J. Control. Release* **138**, 103–12 (2009).
130. Wisplinghoff, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: Epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 686–691 (2003).
131. Mack, D., Horstkotte, M. A., Rohde, H. & Knobloch, J. K.-M. in *Biofilms Infection*

LITERATUR

- and Antimicrobial Therapy* (Taylor & Francis Group, 2006).
132. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol.* **7**, 555–567 (2009).
 133. Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U. & Mack, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 103–111 (2010).
 134. Christner, M. *et al.* The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.* **75**, 187–207 (2010).
 135. Vuong, C. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects. *Cell. Microbiol.* **6**, 269–275 (2004).
 136. Kristian, S. A. *et al.* Biofilm Formation Induces C3a Release and Protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and Complement Deposition and from Neutrophil- Dependent Killing. *J. Infect. Dis.* **197**, 1028–1035 (2008).
 137. Keefe, A. D., *et al.* Aptamers as Therapeutics. *Nat Rev Drug* **9**, 537–550 (2010).
 138. Tolle, F., Brändle, G. M., Matzner, D. & Mayer, G. Ein universeller Zugang zu Nucleobasen-modifizierten Aptameren. *Angew. Chemie* **127**, 11121–11125 (2015).
 139. Burley, G. A. *et al.* Directed DNA metallization. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1398–1399 (2006).
 140. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2**, 565–632 (1963).
 141. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angew. Chemie* **113**, 2056–2075 (2001).
 142. Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)- Catalyzed Azide–Alkyne Cycloadditions B. *Science* **340**, 457–460 (2013).
 143. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
 144. Purschke, W. G., Eulberg, D., Buchner, K., Vonhoff, S. & Klussmann, S. An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5173–8 (2006).
 145. Sooter, L. J. & Ellington, A. D. Reflections on a novel therapeutic candidate. *Chem. Biol.* **9**, 857–858 (2002).

LITERATUR

146. Ray, P., Viles, K. D., Soule, E. E. & Woodruff, R. S. Application of aptamers for targeted therapeutics. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **61**, 255–271 (2013).
147. Raymond, S. & Weintraub, L. Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Science (80-)*. **130**, 711 (1959).
148. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing. *Nat. Publ. Gr.* **7**, 335–336 (2010).
149. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Unicycler : resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Comput. Biol.* 1–20 (2017).
150. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
151. Dustin, M., Rothlein, R., Bhan, A., Dinarello, C. & Springer, T. Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245–254 (1986).
152. Büttner, H., Mack, D. & Rohde, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 1–15 (2015).
153. Griffiths, P. G., Elliot, T. S. J. & McTaggart, L. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to intraocular lenses. *Br. J. Ophthalmol.* **73**, 402–406 (1989).
154. Cibiel, A., Dupont, D. M. & Ducongé, F. Methods to identify aptamers against cell surface biomarkers. *Pharmaceuticals* **4**, 1216–1235 (2011).
155. Jun, C., Shimaoka, M., Carman, C. V., Takagi, J. & Springer, T. A. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *PNAS* **98**, 6830–6835 (2001).
156. Yang, Y. *et al.* Structural Basis for Dimerization of ICAM-1 on the Cell Surface. *Mol. Cell* **14**, 269–276 (2004).
157. Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J. & Mayer, G. By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
158. Haraguchi, N. *et al.* CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int. J. Oncol.* **43**, 425–430 (2013).
159. Mencin, N. *et al.* Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **91**, 151–159 (2014).
160. Schütze, T. *et al.* A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO-a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **38**, (2009).
161. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic*

LITERATUR

- Acids Res.* **16**, 10881–10890 (1988).
162. Kikin, O., D'Antonio, L. & Bagga, P. S. QGRS Mapper: A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, 676–682 (2006).
163. Bailey, T. & Elkan, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Second Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **2**, 28–36 (1994).
164. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
165. Magnus, M., Boniecki, M. J., Dawson, W. & Bujnicki, J. M. SimRNAweb: a web server for RNA 3D structure modeling with optional restraints. *Nucleic Acids Res.* **44**, W315–W319 (2016).
166. Segal, G. M., Smith, T. D., Heinrich, M. C., Ey, F. S. & Bagby Jr., G. C. Specific repression of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factor gene expression in interleukin-1-stimulated endothelial cells with antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* **80**, (1992).
167. Li, W. *et al.* The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **43**, 580–584 (2015).
168. Gea-Banacloche, J. C. & Weinberg, G. A. Monoclonal antibody therapeutics and risk for infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**, 1049–1052 (2007).
169. Meisel, K. & Rizvi, S. Complications of monoclonal antibody therapy. *Med Heal. R I* **94**, 317–319 (2011).
170. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
171. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
172. Lombardi, D. G. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115 (2006).
173. Rothenberg, M. & Clarke, M. in *Essentials of Stem Cell Biology* 469–483 (Academic Press, 2009).
174. Demers, M.-J. *et al.* Intestinal epithelial cancer cell anoikis resistance: EGFR-mediated sustained activation of Src overrides Fak-dependent signaling to MEK/Erk and/or PI3-K/Akt-1. *J. Cell. Biochem.* **107**, 639–654 (2009).
175. Choi, S. R. *et al.* Biological properties and expression of mucins in 5-fluorouracil resistant HT29 human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 141–147 (2000).

LITERATUR

176. Christner, M. *et al.* SarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Mol. Microbiol.* **86**, 394–410 (2012).
177. Loetsch, C. *et al.* Cytosolic Recognition of RNA Drives the Immune Response to Heterologous Erythrocytes. *Cell Rep.* **21**, 1624–1638 (2017).
178. Leitner, W. W., Ying, H. & Restifo, N. P. DNA and RNA-based vaccines: Principles, progress and prospects. *Vaccine* **18**, 765–777 (1999).
179. Zhou, J. & Rossi, J. J. Cell-type-specific, aptamer-functionalized agents for targeted disease therapy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **3**, 1–17 (2014).
180. Chambers, V. *et al.* High-resolution sequencing of DNA G-quadruplex secondary structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.* 1–21 (2015). doi:10.1074/jbc.M109.094953
181. Li, K. *et al.* Chemical modification improves the stability of the DNA aptamer GBI-10 and its affinity towards tenascin-C. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 1174–1182 (2017).
182. Tolle, F. & Mayer, G. Dressed for success-applying chemistry to modulate aptamer functionality. *Chem. Sci.* **4**, 60–67 (2013).
183. Weis, W. I. & Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441–473 (1996).
184. Ouellet, E., Foley, J. H., Conway, E. M. & Haynes, C. Hi-Fi SELEX: A high-fidelity digital-PCR based therapeutic aptamer discovery platform. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1506–1522 (2015).
185. Marshall, K. & Ellington, A. Molecular parasites that evolve longer genomes. *J Mol Evol* **49**, 656–663 (1999).
186. Wang, G. *et al.* Selection and characterization of DNA aptamer against glucagon receptor by cell-SELEX. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
187. Li, W. M., Zhou, L. L., Zheng, M. & Fang, J. Selection of Metastatic Breast Cancer Cell-Specific Aptamers for the Capture of CTCs with a Metastatic Phenotype by Cell-SELEX. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **12**, 707–717 (2018).
188. Simon-Assmann, P. *et al.* Adhesive properties and integrin expression profiles of two colonic cancer populations differing by their spreading on laminin. *J Cell Sci* **107** (Pt 3, 577–587 (1994).
189. Zanetti-Domingues, L. C., Martin-Fernandez, M. L., Needham, S. R., Rolfe, D. J. & Clarke, D. T. A Systematic Investigation of Differential Effects of Cell Culture Substrates on the Extent of Artifacts in Single-Molecule Tracking. *PLoS One* **7**, (2012).
190. Mittelberger, F. *et al.* RAID3 - An interleukin-6 receptor-binding aptamer with post-selective modification-resistant affinity. *RNA Biol.* **12**, 1043–1053 (2015).

LITERATUR

191. Mcconlogue, L., Brawl, M. A. D. & Innisl, M. A. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9869 (1988).
192. Mcdowell, D. G., Burns, N. A. & Parkes, H. C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3340–3347 (1998).
193. Mclaughlin, S. Development of cold switchable DNA aptamers for isolation of cells that express leukemia inhibitory factor receptor . (2015).
194. Ray, P. & White, R. R. Cell-SELEX Identifies a “Sticky” RNA Aptamer Sequence. *J. Nucleic Acids* **2017**, 1–9 (2017).
195. Frohnmeier, E. DNA-Aptamere Selektion und Anwendung zum spezifischen Nachweis von AB5-Toxinen. (Universität Hamburg, 2019).
196. Kypr, J., Kejnovská, I., Renčiuk, D. & Vorlíčková, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1713–1725 (2009).
197. Chang, Y. M., Chen, C. K. M. & Hou, M. H. Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3394–3413 (2012).
198. Lai, Y.-T. & DeStefano, J. J. DNA Aptamers to Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Selected by a Primer-Free SELEX Method: Characterization and Comparison with Other Aptamers. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 162–176 (2012).
199. Lane, A. N., Chaires, J. B., Gray, R. D. & Trent, J. O. Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5482–5515 (2008).
200. Szameit, K. D. An investigation into the structure and specificity of a G-Quadruplex RNA-aptamer. (Universität Hamburg, 2016).
201. Rachwal, P. A., Brown, T. & Fox, K. R. Effect of G-tract length on the topology and stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Biochemistry* **46**, 3036–3044 (2007).
202. Ulrich, H. & Wrenger, C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytom. Part A* **75**, 727–733 (2009).
203. Galas, D. & Schmitz, A. DNAase Footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3157–3170 (1978).
204. Varizhuk, A. M. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro activity of thrombin-binding DNA aptamers with triazole internucleotide linkages. *Eur. J. Med. Chem.* **67**, 90–97 (2013).
205. Ruckman, J. *et al.* 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF 165). *J. Biol. Chem.*

LITERATUR

- 273**, 20556–20567 (1998).
206. Froesch, B. A., Stahel, A. A. & Zwangemeister-Wittke, U. Preparation and functional evaluation of new doxorubicin immunoconjugates containing an acid-sensitive linker on small-cell lung cancer cells. **42**, 55–63 (1996).
207. Faryammanesh, R. Selektion und Charakterisierung Selektin-spezifischer DNA-Aptamere. (2014).
208. Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* **4**, 1115–1121 (2006).
209. Tanner, N. Improved Reagents for Isothermal DNA Amplification Amplification. *www.neb-online.de* 1–4 Available at: http://www.neb-online.de/wp-content/uploads/2015/04/NEB_isothermal_amp.pdf.
210. Ma, Q. *et al.* Development of a lateral flow recombinase polymerase amplification assay for rapid and visual detection of *Cryptococcus neoformans/C. gattii* in cerebral spinal fluid. *BMC Infect. Dis.* **19**, 1–9 (2019).
211. Ilgu, M. & Nilsen-Hamilton, M. Aptamers in Analytics. *Analyst* **141**, 1551–1568 (2016).
212. Khoshouei, M., Radjainia, M., Baumeister, W. & Danev, R. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nat. Commun.* **8**, 1–6 (2017).
213. Koshland D E, J. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 98 (1958).
214. Szameit, K. *et al.* Structure and target interaction of a G-quadruplex RNA-aptamer. *RNA Biol.* **13**, 973–987 (2016).
215. Aigner, S. *et al.* CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* **12**, 1241–1251 (1998).
216. Kruspe, S. & Hahn, U. Ein intrinsisch 5-Fluor-2' -desoxyuridin beinhaltendes Aptamer für die gezielte Chemotherapie. *Angew. Chemie* **126**, 10711–10715 (2014).

10 Danksagung

Als Allererstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Uli Hahn bedanken. Ich bin nicht nur stolz darauf, ein Teil seines Forschungsteams gewesen zu sein, sondern vor allem auch seine letzte Doktorandin. Dabei währten seine Unterstützung und sein Vertrauen auch noch nach seiner Emeritierung fort. Uli, ich wünsche Dir einen verdienten und erholsamen Ruhestand!

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten.

Mein großer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Zoya Ignatova, die mich nach dem Ruhestand von Prof. Hahn nicht nur in ihren Laboren, sondern auch in ihrer Arbeitsgruppe willkommen geheißen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Mayer möchte ich mich für die lehrreiche Zeit an der Universität Bonn, konstruktive Gespräche und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Bei Herrn Dr. Andreas Czech möchte ich mich dafür bedanken, dass Du durch dein interdisziplinäres Denken nicht nur mir neue Ideen geliefert hast, sondern auch, dass Du dein Wissen so gut weiter vermitteln kannst!

Ich möchte mich herzlich bei Frau Dr. Anna Schulz bedanken für ihren Beistand in den letzten Monaten und das invertierte Lächeln. Vielen Dank, dass Du mich bei der Korrektur dieser Arbeit so intensiv unterstützt hast.

Vielen Dank an meinen Bachelorstudenten Herrn Tobias Sitz für die gute Arbeit und die erfolgreiche Selektion.

Herrn Dr. Patrick Ziegel Müller danke ich für sein offenes Ohr und seine guten Vorschläge.

Der gesamten AG Hahn sage ich natürlich auch tausendmal Danke! Dank an Dr. Kristina Solecki für das Teilen des Labors, des Wissens und des Sektes. Danke Kristina, dass Du dir das Korrekturlesen dieses Werkes angetan hast! Vielen Dank an Dr. Florian Mittelberger, Dr. Rassa Faryamannesh und Dr. Katharina Redder für das Teilen Eurer Erfahrungen zum Thema Aptamere. Bei Dr. Katrin Seelhorst und Dr. Sven Kruspe möchte ich mich für deren offenes Ohr und die vielen Ratschläge bedanken. Danke an Dr. Sina Haas für Deine Unterstützung bei der Praktikabetreuung. Mein

DANKSAGUNG

herzlicher Dank geht auch Frau Daniela Hess-Otto für Hilfe in jeder Hinsicht. Ich bedanke mich bei Herrn Marc Steinmayer für seine Hilfe bei den Plasmidisolierungen nach der Klonierung für CD24 sowie ICAM-1. Bei Dr. Eileen Waldmann und Frau Claudia Dziarnowski bedanke ich mich für die Klonierung des Pools nach der Selektion für das Embp125-Molekül.

Danke meiner Schwester, Marta Fafińska für ihre wertvollen Computer-Tipps. Schwesterherz, ohne Dich wäre es für mich nicht möglich, die NGS-Daten auszuwerten (Dziękuję)!

Ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Ignatova für die freundliche Aufnahme und für die umfassende Hilfe bei allen Problemen ganz herzlich bedanken. Ich danke insbesondere Herrn Johannes Wagner für die Hilfe bei den ersten Schritten bei der NGS-Auswertung. Vielen Dank an Giovana Bampi und Pryanika Nair für das Teilen des Büros und für eure Freundschaft.

Mein Dank geht auch an die AG von Prof. Günter Mayer. Mit jedem von Euch war es schön meine Zeit im Labor sowie außerhalb zu verbringen. Danke Olga Plückthun, dass du mit so viel Geduld mich in die Selektion der Aptamere und die Bindungsstudien eingearbeitet hast. Ich danke Herrn Fabian Tolle für das Teilen deines Wissens über die Clickmere. Mein besonderer Dank geht an Frau Laura Lledó Bryant, für das Vorbereiten der NGS-Daten, die Analyse mit deiner Software und für Deine Freundschaft (¡Muchas gracias!).

Frau Dr. Anna Bauer Danke ich für ihre Freundschaft und dass sie mich bei keiner meiner Abschlussarbeiten der deutschen Sprache ausgeliefert hat!

Dr. Frau Tanja Kotur danke ich für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft. Vielen Dank an Dr. Herrn Volker Ambroselli für das Korrekturlesen der Arbeit. Bei Frau Dr. Theresa Nuguid bedanke ich mich, dass sie es nie zuließ, dass ich das Mittagessen ausfallen ließ und für das finale Lesen der gesamten Arbeit.

Danke an Frau Dr. Esther Frohmeyer für die stundenlangen SELEX-Gespräche, die sich bis auf unseren Feierabend ausdehnten.

Danke an Frau Dr. Sandra Mühmel für gemeinsamen Sportstunden nach dem Laborfeierabend und für Dein Feedback zur meiner Einleitung. Ich danke Frau Anna Bergemann, dass Du so eine gute Freundin bist und insbesondere für die schönen

DANKSAGUNG

Abende, die ich mit Dir, Theresa und Svetlana im ersten Jahr meiner Doktorarbeit verbracht habe.

Anna Andrzejewska i Aleksandra Knaflewska, Dziękuję wam za Wasza Przyjaźń i wsparcie!

Danke an Frau Dr. Roberta D'Agostino und Herrn Georg Tilch für die Unterstützung bei der Formatierung der Arbeit!

Mein herzlicher Dank geht auch an Herrn Dr. Thomas Behrens für seine Unterstützung bei der Suche nach der Promotionsstelle.

Danke an meine Kooperationspartner Herr Dr. Daniel Wicklein und Herr Dr. Henning Büttner für die Bereitstellung der Materialien.

Schließlich danke ich Paweł für seine emotionale Unterstützung und dafür, dass er nie aufgehört hat, an mich zu glauben.

11 Erklärung an Eides statt

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht bei einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, 16.07.2019 Joanna Aleksandra Fafińska

12 Anhang

12.1 SELEX-Methoden

12.1.1 Aptamer-Selektio für das CD24-Molekül

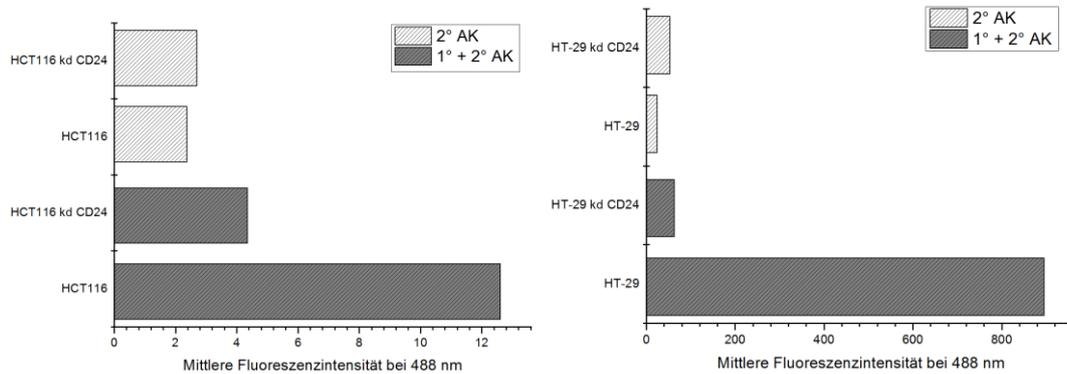


Abb. 63: Durchflusszytometrische Studien zur Bindung des ML-5 Antikörpers an HCT116- und HT-29-Zellen. HT-29-Zellen banden mehr Antikörpermoleküle, deswegen produzierten sie auch mehr CD24-Moleküle als die HCT116-Zellen. Die Skalierung der beiden Achsen ist unterschiedlich.

12.1.1.1 Zell-SELEX (HTC116-Zellen)

Tab. 59: Bedingungen der ersten SELEX für das CD24-Molekül. Die Zell-SELEX wurde bei 37 °C durchgeführt. Als Target dienen die HCT116-Zellen. Als negative Zelllinie dienen die HCT116 *Knockdown* CD24-Zellen.

Runde	PCR-Zyklenzahl	Bemerkung
1	10+3	HCT116-Zellen; Inkubation: 1 h in 300 µL; 3x Waschen
2	10+4	HCT116-Zellen; Inkubation: 1 h in 300 µL; 3x Waschen
3	10+5	HCT116-Zellen; Inkubation: 1 h in 550 µL; 3x Waschen
4	10+5	HCT116-Zellen; 1 h; HCT116-Zellen; Inkubation: 1 h in 580 µL; 3x Waschen
5	10+33	HCT116-Zellen und HCT116 <i>Knockdown</i> CD24-Zellen; Inkubation: 1 h in 580 µL; 3x Waschen

ANHANG

12.1.1.2 SELEX mit rekombinantem Protein und mit HT-29-Zellen

Human CD24 (Met1-Gly59)	IEGRMD	Human IgG ₁ (Pro100-Lys330)
----------------------------	--------	-------------------------------------------

Human CD24: MGRAMVARLG LGLLLLALLL PTQIYSSETT TGTSSNSSQS TSNSGLAPNP
TNATTKAAG

Human IgG₁: P KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA
LPAPIEKTTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Abb. 64: Das rekombinante humane CD24-IgG₁-Fusionsprotein. Die Aminosäuren mit primären Aminogruppen sind gelb hervorgehoben. Diese konnten an die Carboxyl-Beads kovalent binden und somit zur Strukturheterogenität des Targets führen. Zusätzlich ist die Sequenz des IgG1-Proteins dargestellt, welches für die negative Selektion benutzt wurde.

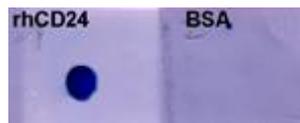


Abb. 65: Dot-Blot zur Kontrolle der Antikörper-rekombinanten-Protein-Bindung. Es wurden je 5.0 pmol Protein (rhCD24 oder BSA) auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen und mit dem CD24-Antikörper inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels der Reaktion des Reporterenzymes alkalische Phosphatase mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).

ANHANG

Tab. 60: Bedingungen der zweiten SELEX für das CD24-Molekül. Die SELEX wurde bei 37 C durchgeführt. Als Target dienten die HT-29-Zellen oder die an *Beads* immobilisierten Proteine. Als negative Zelllinie dienten die HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen.

Runde	PCR-Zyklenzahl	Bemerkung
1	15	4x Waschen mit 100 µL
2	5 (nur negative-SELEX mit IgG)	
3	15	4x Waschen mit 100 µL
4	18	5x Waschen mit 150 µL
5	16	6x Waschen mit 150 µL
6	19	6x Waschen mit 150 µL
7	21 (negative-SELEX mit IgG)	7x Waschen mit 150 µL
8	18 (negative-SELEX mit IgG)	3x Waschen mit 120 µL
9	17 (negative-SELEX mit IgG)	4x Waschen mit 120 µL
10 Zell-SELEX	10+6	30 Min. Inkubation; 4x Waschen
11 Zell-SELEX	10+9	25 Min. Inkubation; 5x Waschen
12 Zell-SELEX	14+4	25 Min. Inkubation; 10x Waschen
13 Zell-SELEX	12+6	25 Min. Inkubation; 10x Waschen
14 Zell-SELEX	12+6	25 Min. Inkubation; 10x Waschen
15 Zell-SELEX	12+8	20 Min. Inkubation; 10x Waschen

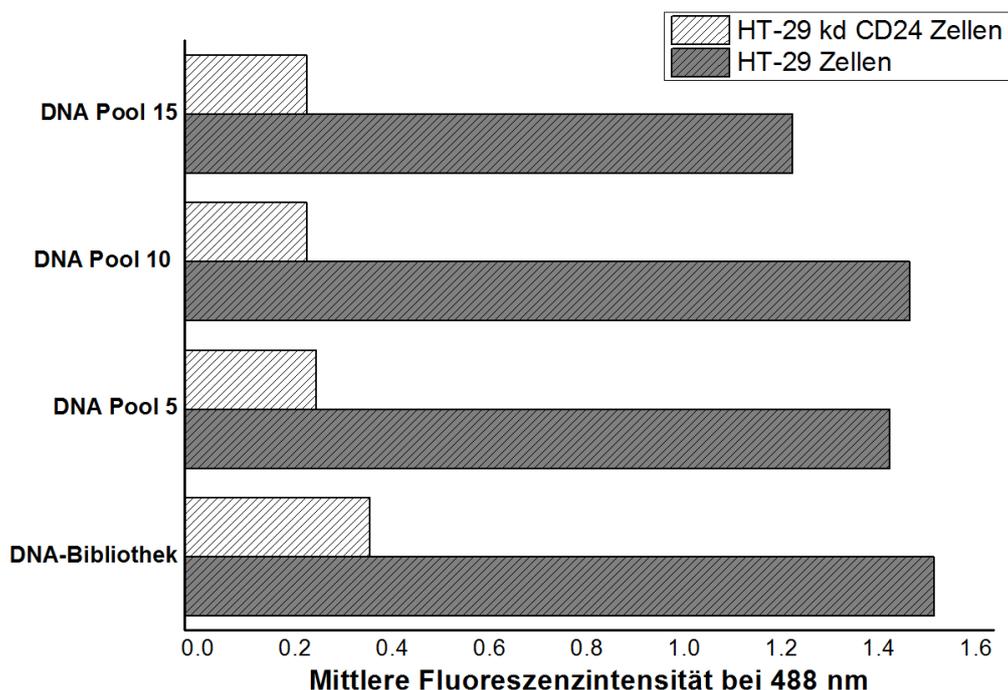


Abb. 66: Bindungsstudien der DNA-Bibliothek und der DNA-Pools aus Runden 5, 10 und 15. Die HT-29-Zellen die das CD24-Molekül auf der Oberfläche präsentierten und die das Protein runterreguliert haben (HT-29 CD24 kd-Zellen) wurden einer Bindung an die entsprechenden Pools ausgesetzt. Als Maß der Bindung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität bei 488 nm gemessen. Die DNA-Pools wurden zuvor mit FITC fluoreszenzmarkiert. Die Signale wurden von der Autofluoreszenz der jeweiligen Zelllinie bereinigt.

12.1.1.3 Click-SELEX (Indol- und Guanidiniumazid)

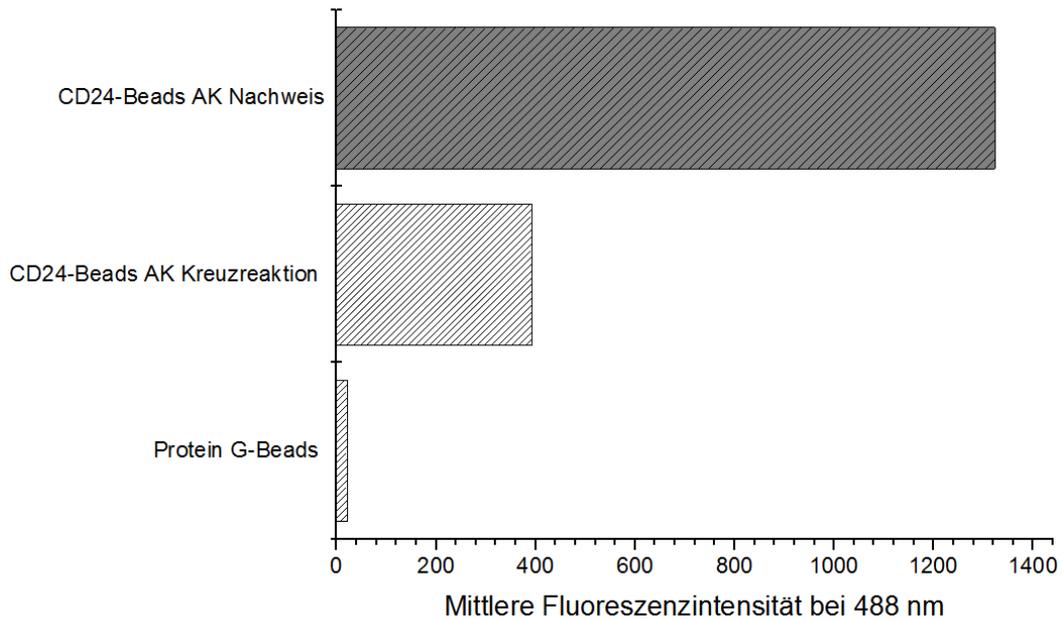


Abb. 67: CD24-Kopplungskontrolle an Protein G magnetische *Beads*. Hierzu wurden die zuvor mit CD24 modifizierten *Beads* mit dem CD24- spezifischen Antikörper inkubiert. Da der Nachweis über den sekundären (2°) FITC-markierten AK verlief, wurde mit diesem die Kreuzreaktion gemessen.

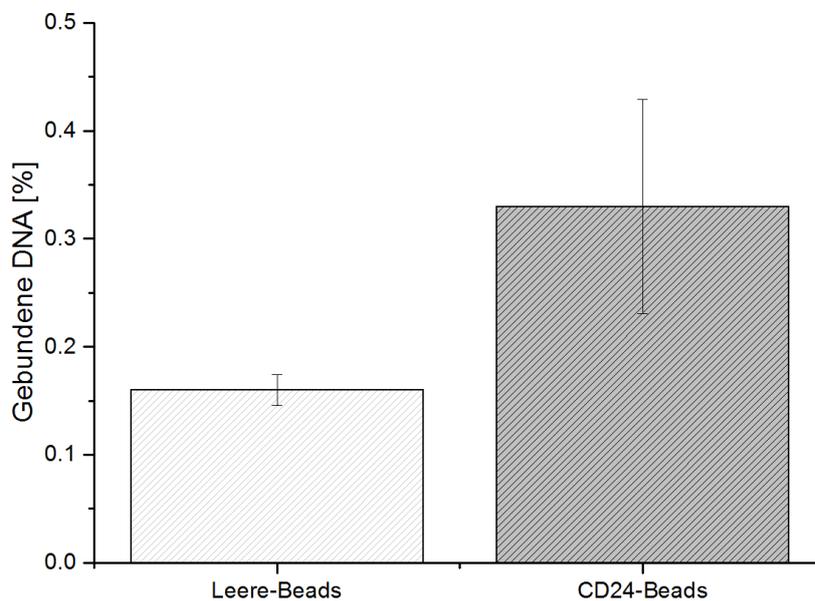


Abb. 68: Die Affinität des alkinierten DNA-Pools zu den entsprechenden *Beads*. Zum einen wurden die leeren Protein-G-*Beads* und zum anderen die Protein-G-*Beads* beladen mit CD24-IgG-Chimera-Protein getestet. Die DNA wurde radioaktiv markiert. Nach dem Waschen wurde die Restmenge an Radioaktivität prozentual errechnet (n= 2).

ANHANG

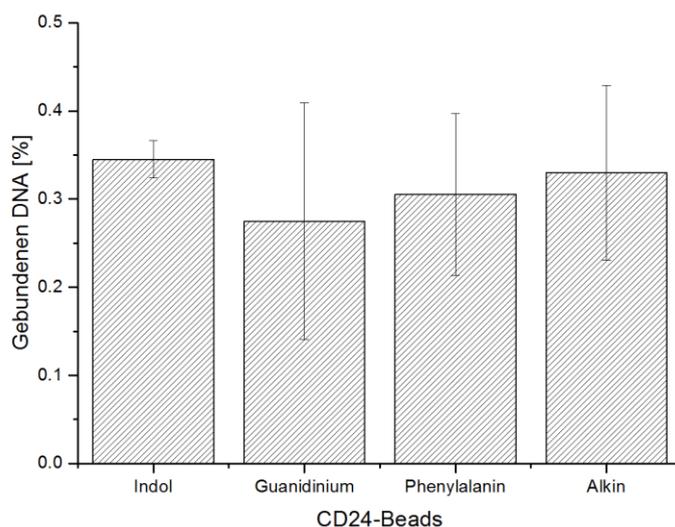


Abb. 69: Die Affinitäten der substituierten DNA-Pools gegenüber den mit CD24-beladenen *Beads*. Die Affinitäten der modifizierten DNA-Pools wie auch die des Ausgangspools (alkiniert) ähneln sich untereinander (n= 2).

Click-SELEX mit Indol-substituiertem DNA-Pool

Tab. 61: Die Bedingungen der *Click-SELEX* mit Indol-substituierten Oligonukleotiden. IgG B: mit IgG-beladene magnetische *Beads*; B: unbehandelte magnetische *Beads*; @: bei; s. o.: siehe oben. Gewaschen wurde mit je 500 μ L SELEX-Puffer. Das Waschen wurde unter dynamischen Bedingungen durchgeführt, die entweder in einem Inkuabtionsschüttler bei 800 rpm oder durch das Pipettieren erreicht wurden.

Runde	Leere- <i>Beads</i>	CD24- <i>Beads</i> [μ L]/ Protein [μ g]	Waschen	Dextran- sulfat [mg/mL]	<i>Click</i> - Kompetitor [pmol]	PCR- Zyklen
1	50 μ L B	80 μ L 1.0 μ g	2x 30 s @ 37 °C 800 rpm	0	50	10
2	20 μ L IgG B	50 μ L 0.6 μ g	1x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0	50	12
3	50 μ L B	50 μ L 0.6 μ g	1x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0	100	8
4	25 μ L IgG B	50 μ L 0.6 μ g	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	11
5	50 μ L B/ 25 μ L IgG B	50 μ L 0.6 μ g	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	14
6	s. o.	50 μ L 0.6 μ g	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	10

ANHANG

7	50 µL B/ 45 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x durch Pipettieren 2x s. o.	0.1	100	8
8	50 µL B/ 50 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x durch Pipettieren 1x 5 Min. 1x durch Pipettieren 1x 5 Min.	0.1	100	16
9	50 µL B/ 50 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	s. o.	0.1	100	10
10	50 µL B/ 50 µL IgG B und 75 µL B/ 75 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	s. o.	0.1	100	16

Click-SELEX mit Guanidinium-substituiertem DNA-Pool

Tab. 62: Die Bedingungen der Click-SELEX mit Guanidinium-substituierten Oligonukleotiden.
IgG B: mit IgG-beladenen magnetischen *Beads*; B: unbehandelte magnetische *Beads*; @: bei; s. o.: siehe oben. Gewaschen wurde mit je 500 µL SELEX-Puffer.

Runde	Leere- <i>Beads</i>	CD24- <i>Beads</i> [µL]/ Protein [µg]	Waschen	Dextran- sulfat [mg/mL]	Click- Kompetitor [pmol]	PCR- Zyklen
1	50 µL B	50 µL 0.6 µg	2x 30 s @ 37 °C 800 rpm	10	100	30
2	50 µL B	80 µL 1.0 µg	1x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0	50	10
3	20 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	1x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0	50	10
4	50 µL B	50 µL 0.6 µg	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0	100	8
5	25 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	15
6	50 µL B/ 25 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x 5 Min. @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	10
7	s. o.	50 µL 0.6 µg	2x durch Pipettieren 2x s. o.	0.1	100	10

ANHANG

8	50 µL B/ 45 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x durch Pipettieren 1x 5 Min. 1x durch Pipettieren 1x 5 Min.	0.1	100	10
9	50 µL B/ 50 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	s. o.	0.1	100	16
10	50 µL B/ 50 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	s. o.	0.1	100	8
11	50 µL B/ 50 µL IgG B	50 µL 0.6 µg	2x 30 s @ 37 °C 800 rpm	0.1	100	16

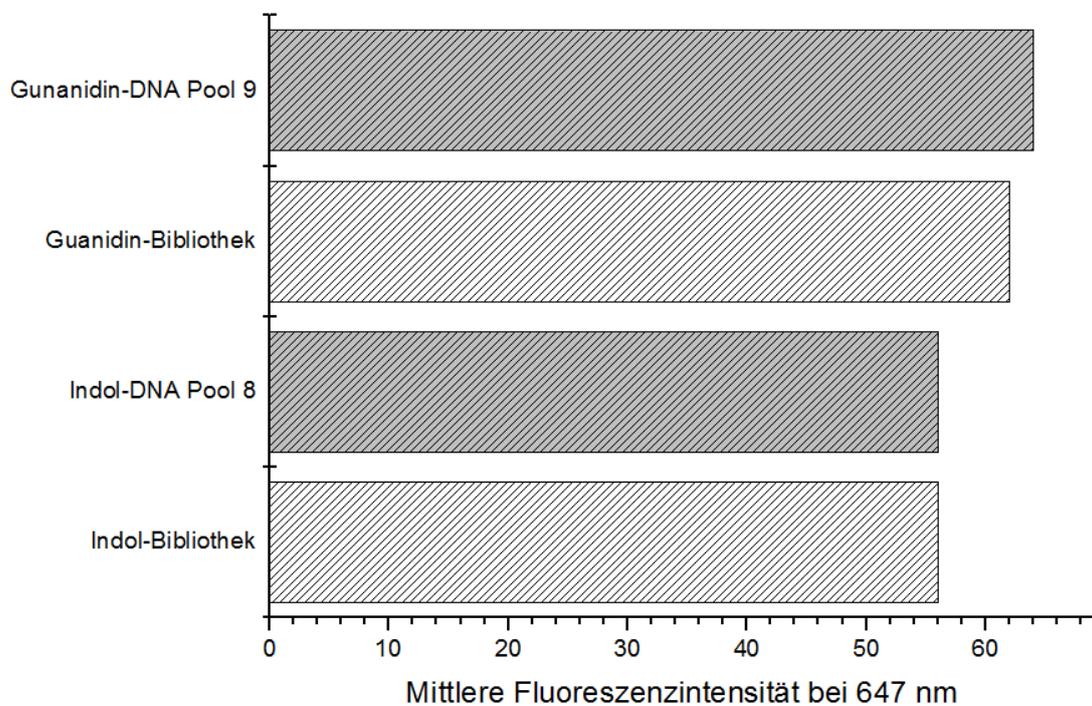


Abb. 70: FACS-Bindungsstudie der DNA-Bibliotheken und den DNA-Pools aus der 8. und 9. SELEX-Runde. Hierzu wurden die Indol-modifizierten DNA-Pools (250 nM) und die Guanidinium-modifizierten DNA-Pools (175 nM) der Bindung an die Target-Beads ausgesetzt (n = 1).

12.1.1.4 Zell-SELEX (HT-29-Zellen)

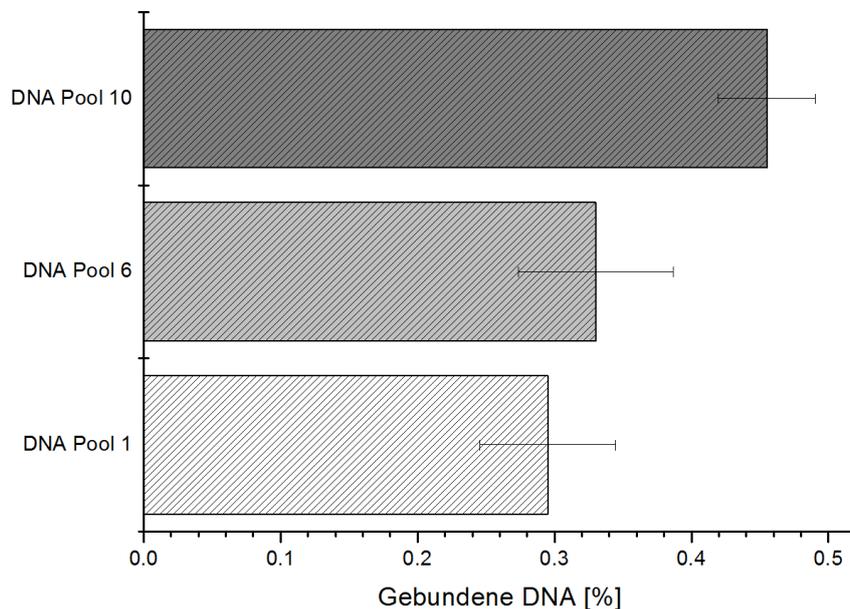


Abb. 71: Radioaktive Bindungsstudien für die DNA-Pools aus unterschiedlichen Zell-SELEX-Runden. Blau: DNA-Pool aus Runde 1; orange: Runde 6; violett: Runde 10 (n= 2).

12.1.2 Selektion von Aptameren für CD54 (ICAM-1)

Die Erkennung des Epitops CD54 auf der Zelloberfläche der HCT116-Zellen wurde mittels spezifischen Antikörpern in durchflusszytometrischen Studien durchgeführt.

a) HCT116-Zellen

ANHANG

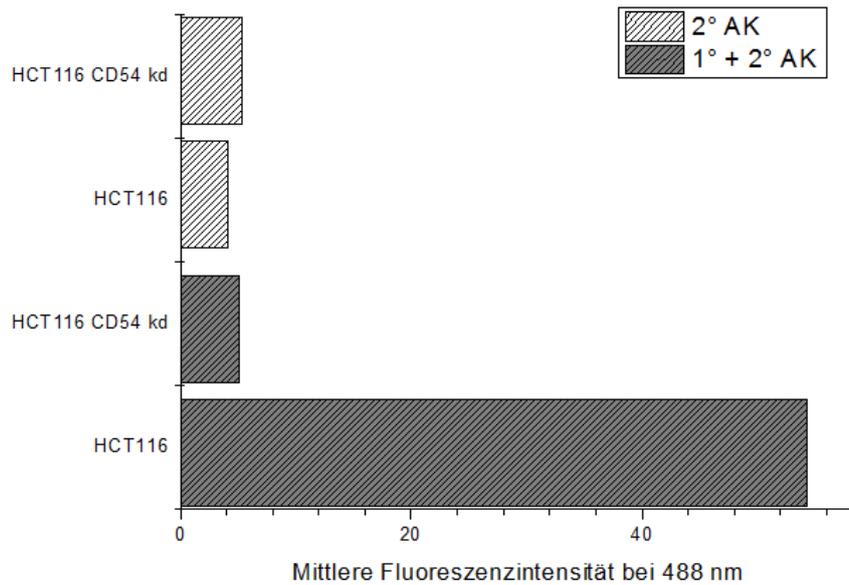


Abb. 72: Nachweis der CD54-Produktion auf den HCT116-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die HCT116-Zellen und die *Knockdown* CD54-Zellen zunächst einer Bindung an die 1° AK unterzogen und dann mit fluoreszenzmarkiertem (FITC) 2° AK (hell) inkubiert. Mögliche Kreuzreaktionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden mit den Zellen und dem 2° AK gemessen (dunkel).

b) PC3-Zellen

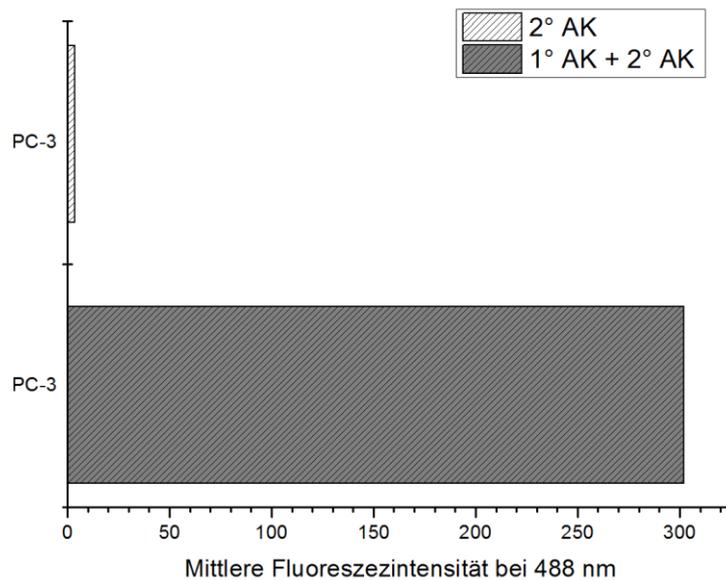


Abb. 73: Nachweis der CD54-Produktion auf den PC3-Krebszellen mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die PC3-Zellen zunächst einer Bindung an die 1° AK unterzogen und dann den fluoreszenzmarkierten (FITC) sekundären Antikörpern (dunkel) ausgesetzt. Mögliche Kreuzreaktionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden gemessen, indem die Zellen mit dem 2° Antikörper alleine inkubiert wurden (hell).

ANHANG

Tab. 63: Bedingungen während der SELEX-Runden sowie die Anzahl an PCR-Zyklen.

Runde	HCT116-Zellen	HCT116 Knockdown CD54-Zellen	Waschschritte (V=mL)	HCT116-Zellen Inkubationszeit [h]	Knockdown CD54-Zellen Inkubationszeit [h]	PCR-Zyklen
1	x	–	3	1	–	10+4
2	x	–	3	1	–	10+5
3	x	–	3	1	–	10+5
4	-	x	3	1	0.50	10+5
5	x	x	3	1	0.50	6+5
6	x	x	3	0.75	0.50	10+6
7	x	x	3	0.50	0.50	10+6
8	x	x	3	0.50	0.50	10+6
9	x	x	4	0.50	0.50	10+6
10	x	x	5	0.50	0.50	10+10
11	x	x	5	0.50	0.50	10+8
12	x	x	4	0.33	0.50	10+7
13	x	x	5	0.33	0.50	10+6

*bei 80% Konfluenz; x: trifft zu; -: trifft nicht zu

12.1.3 Selektion von Aptameren für das Embp170-Molekül

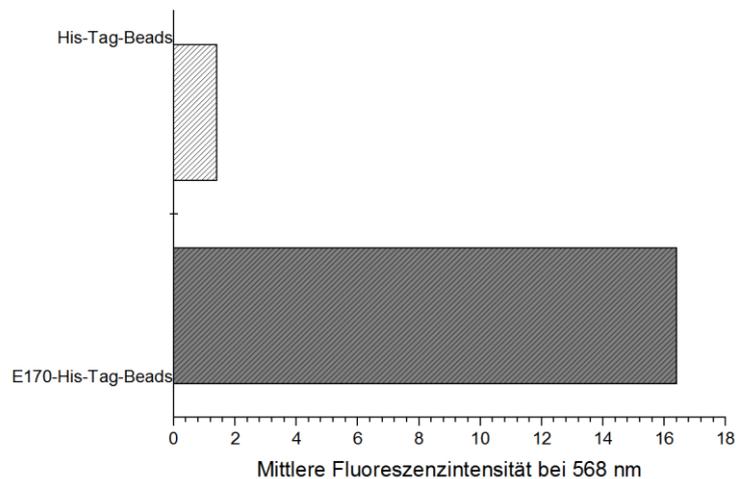


Abb. 74: Nachweis des Embp170-Proteins auf der *Bead*-Oberfläche. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten bei 568 nm wurden gemessen.

ANHANG

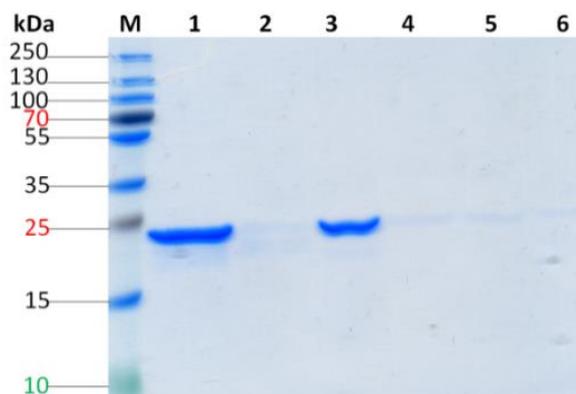


Abb. 75: 15%iges SDS-PAA-Gel zur Kontrolle des Embp170-Proteins an magnetische *Beads*. In Spur M: 4 μ L *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*; Spur 1: 2.9 μ G Embp170 Protein; Spur 2: 10 μ L Überstand nach der Inkubation mit Embp170-Protein (max. 2.9 μ g Protein); Spur 3: Embp170 Protein (2.9 μ g); Spur 2: 10 μ L Eluat-Lösung (max. 2.9 μ g Protein); Spuren 4-6: je 10 μ L Waschfraktion (max. 2.9 μ g Protein). Die Detektion der Proteine erfolgte mit der Coomassie-Blau-Färbung.

Tab. 64: Übersicht über die Bedingungen während der SELEX-Runden sowie die PCR-Zyklusanzahl.

Runde	Embp170- <i>Beads</i> [μ L]	Leere- <i>Beads</i> [μ L]	Wasch- schritte [mL]	DNA		Hering- DNA [μ g]	Kompetitive DNA [pmol]	PCR- Zyklen C/ N- SELEX	
				C/ SELEX [pmol]	N- SELEX [pmol]			C/	N-
1	80	80	1x 5 Min.	900	0.1	-	-	12/ 13	
2	80	80	1x 5 Min.	32	0.1	-	-	17/ 17	
3	80	80	1x 5 Min.	20	0.1	-	-	20/ 20	
4	40	40	2x 5 Min.	12/ 15	0.1	-	-	18/ 18	
5	20	20	2x 5 Min.	25	0.1	-	-	18/ 16	
6	20	20	2x 5 Min.	22/ 14	0.1	5	-	16/ 14	
7	20	20	3x 5 Min.	54/ 59	0.1	15	-	16/ 14	
8	80	20	3x 5 Min.	77/ 67	0.1	40	-	18/ 18	
9	80	20	3x 5 Min.	52/ 56	0.1	50	-	18/ 18	
10	80	20	3x 5 Min.	48/ 21	0.1	100	-	20/ 14	
11	80	40	3x 5 Min.	37/ 58	0.1	100	-	18/ 17	
12	80	80	3x 5 Min.	37/ 42	0.1	100	-	17/ 16	

12.1.4 Selektion von Aptameren für das Embp125-Molekül

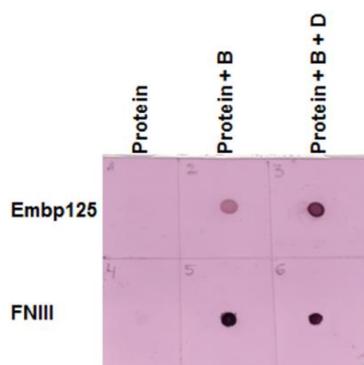


Abb. 76: Dot-Blot zur Kontrolle der Biotinylierung des Embp125 sowie der FNIII. Hierbei sind die Dot-Blots für die drei verwendeten Proteine dargestellt. In der Spalte Protein wird nur das Protein aufgetragen. In der Spalte Protein + B ist das biotinylierte Protein getupfelt. In der letzten Spalte (Protein + B + D) sind die biotinylierten Proteine nach der Dialyse zu sehen.

Tab. 65: Übersicht über die Bedingungen während der SELEX-Runden sowie die Anzahl an benötigten PCR-Zyklen.

Runde	Embp125-Beads	Kompetitive SELEX	Waschschritte [mL]	SELEX Vol. [μ L]	MgCl ₂ [mM]	Inkubation	PCR-Zyklen
1	x	-	3x 100	100	0.50	300 rpm	16
2	x	-	4x 100	100	0.50	300 rpm	16
3	x	-	5x 100	100	0.50	300 rpm	16
4	x	-	6x 100	100	0.50	300 rpm	12
5	x	-	7x 100	100	0.50	300 rpm	14
6	x	-	4x 150	100	0.50	300 rpm	14
7	x	-	5x 150	100	0.50	300 rpm	14
8	x	-	6x 150	100	0.50	300 rpm	16
9	x	-	6x 200	100	0.50	300 rpm	14
10	x	x	6x 200	100	0.50	300 rpm	5
11	x	x	6x 200	100	0.25	300 rpm	5
12	x	x	7x 200	150	0.25	300 rpm	14
13	x	x	7x 300	200	0.25	300 rpm	14
14	x	x	7x 500	300	0.25	500 rpm	16
15	x	x	8x 500	350	0.25	500 rpm	12
16	x	x	9x 500	450	0.25	500 rpm	14
17	x	x	10x 500	500	0.25	500 rpm	14

12.2 Sequenzierung nach Sanger

12.2.1 CD24

Tab. 66: Sequenz der DNAs nach der Klonierung der letzten SELEX-Runde für das CD24-Protein. In der Tabelle sind die Sequenzen der randomisierten Bereiche der Oligonukleotide in 5'→3' Richtung dargestellt.

DNA	Sequenz (5'→3')
1	AAATAACAAAGAAACCAAATTCGCACATCACCCATAACAT
2	TATGTGGGTGGGTGGGCGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT
5	TATGTGGGTGGGTGGGTGGTATGCTGAGTCAGCCTTGCT
6	GAAATCGGTTGTGATCTTTTGTGTTGTTGTTTCTGTAGG
7	CGACTAACACACAAGATACGAACCTTTGCATTAGAACCC
8	TCTTAACGAATAACAAAGAATAACGCGAACGACCTCCTCA
9	CCTACGCCAACAATCAAAAAACAAAACAAAAATAAACA
10	AAGAAAAAGAAACACACATCAAAACACAAAATTTAATTA
17	TTAAAGAAACAAAGAATAAACATCACGATCGGCAACTCGA
18	ACACAGAAAACAAACACTACATAACTGAAGAATCACTCATCA
19	ACAAACAAAAAATGAATAAAAACAAAAGATTACAACACTCA
20	TAAACCTGAAAAAACACAAAAACAACCAGAATACGCATAA
22	TCAGCAAACAGAGAACAGAAAACAGCCCAACACTAA
23	TAAACCACAAAAACAAAATGCACATTCAGATCGCTCTAG
24	AGAGAAAAAATCAGAACCAAAAACCAAAACCCGGCACTAA
25	TTCTCACAAAACACGGAACGAACAACAACGTCACCTCTAT
26	AAAAAGCAAAATGACCGAAGGATCTCACATACGGCACTAC
27	TAAAAGACGAACAGGAGGCTGACAACAGAACAATGTCCAG
28	TGAACAAAAACATAGCCAAAGCAAAAAAAGCTTAACGCACA
30	TAAAAACATATAACTGACAAACCAAATGCGCCAACTCAC
31	CAAAACGAAAAACAAACGACGAAATAGCCTGATTATTAC
32	TCAACCCATCCTAACCACAAAAGTAGACATTCAGCCCATC
33	CCCCACAACCAAGAACACGACTTACCACATTAATTCATCC
34	TTAAACCAAGCAACAACAATAATTAGAACACACATACCA
35	TCAACCAGAGACACCAAAAAAAGGACCAAGAATAACAA
36	GTACTATATGTCTATTTCCTATTAGTTAATTTATATTCTTA
38	GCAACAACCAACCCCAACAAACAAAATGGCTAAACGTC
39	TCAACAAAATAAGCACAAATAAAAACAAACGCACCATAAAA
40	CGATCAAATCGAGCACCAAAAAAACAGTGACTTCACCATTC
41	CTCAAAGCAAACCAAAATAAAAACAGAATGAAAGAGGAGAA
42	GAAGCAAAAATTAACAAGATCCAAATACGCTCGAAGCCC
43	ATCAAAAAACAATCACGGAATGGACCCACTCAACTGTTA
44	ACAAAAGAACTGCTCACAAACGAATATAGACCTATTTCCC
45	ACGTATTGAGTGTGCCCGTCTTCGGTAATGTTTGGATTTG
46	TTAACAAAAAGCACAAACAGCAACTCAAGATCCTTCTAAG
47	TAGCCAAAGAAAGCATCTAATCAACTGCAGAACGACTCCA
48	ACAATCCACAAATTAACACAACAGGGCGGAACACTTCTCA
49	GTACTATATGTCTATTTCCTATTAGTTAATTTATATTCTTA
50	ACACAGCCTGCACATCAAAGAAGTTACAAAACACACACCC
52	TAACACACACATACCAACAGCTAACAACAGGAACTCGGCG

ANHANG

54	TTAAAGAAACAAAGAATAAACATCACGATCGGCAACTCGA
56	CTAAGGCCAAACATCATACTACAAAAAACTCATGAAGG
57	CAACAAAAAAGGAACATCAACTGCTTAACACGAATCA
58	CCAGAAAACATAAACTCAACAATCAACTGATAAACGATCT
59	TACAACAAAACACAAATAAACGAATAGAAACCACCAGTAT
60	GTACTATATGTCTATTTCCTATTGTTAATTTATATTCTTA
61	CAAAGATGACCCTTTAAAAAACAGCAACGGCGAATAA
62	GTAACGACAAAAGCATGAAGCACAGAACAAACCCACTTCG
63	GTACTATATGTCTATTTCCTATTAGTTAATTTATATTCTTA
64	TAAACAAAACAATTGAACAACAAAAACATTTGCAACACA
65	TTAAGAAACCAAAGCTTCGAAACTGACCAGATCCCACCCC
66	ACACAACACAGCAATCAAAACATAAGCAAAGTCTAAGCGT
67	ACAAAACTCCATAAACCGAAAACTGCCAAAACTCAAAA
68	ACAGCAAAAAACAAACTGTAGATGAATCCGGACAAACCCCT
69	GTCACATATTGAGCCAAATAAACGCACTCACAAAAAGGAA
70	GTAACAACCTCTTAGCAGCTAGCAAAACAAAACCTTAAGCA
72	ACGACAAAAAATAATTGAACAAGCAAACCCCTGAAGCGTT
74	ACACCAACAATCCGAACAAGAAAAAGAACTGGAACCTCT
Blau	TTTGTACTTGATAGTTTCAAATGGGATGGAACACTATCAA

12.2.2 ICAM-1

Tab. 67: Sequenz der DNAs nach der Klonierung der letzten SELEX-Runde für das CD54-Protein. In der Tabelle sind die Sequenzen der DNA-Moleküle aus der SELEX für CD54 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden nur die randomisierten Bereiche der Nukleinsäuren in 5'→3' Richtung gezeigt.

DNA	Sequenz (5'→3')
1	TTGTACAGGGCCCTCATCACTTCATTATTCGTCAGGTAGTT
2	TGTTGGGCCGGGTGGTCTTAGATTGTTATCGAGTGATGGA
3	CTCCTGAGGGGTGTTTCAGTTGTTGTAGATTCCAAGGGCTT
5	TTTAGACTCCCACCCTGTTTCGTCTCCTGATCCCTCTCA
7	ATGGATGGGGTGTAGTGGTTTCTGTTATAGCGGTTTAA
9	TTGTAGATATCCTGAATGTAACCCCCCTCTTCCGGTATTA
11	GCCCTCAAATCTCCTCATCTCATGTGCTAATTTCTTAA
12	TCCCTGCTCGATTGCCTTCAAACCTCGCGGCTCATACTATT
14	TAGGTCTCGTAGCCGGCATTTCATTACCCCGCTTATCC
15	CATCCACTTCCCCCTAACCTGCTGTATTCCCGATAACTTG
16	TTAAAATCTCTCTCCCGTCCCTGATTGATGATCTCGGTTT
17	TCCCGTTTTAACCCCTCGCCTTCACTTTCTCAGATATGACT
18	TGACGGACATTCGTGCGTTCTGCCCTAACGATGTGTA
21	GAACCCCGCCCTGTGTTTCTAGTCCTGTTACCCCTTTTGT
22	GGGTTTGTACATAGTTGTGTTAGGGGGCTCCTTCGTTT
23	CAATTCGCGCCTCATTCGTTTCGCCATAATCAGGTTC
24	TCCCGCTCTCTTCCCTGCATCGAACCCCTCGTTGGTATTA
25	TCATTCCCTGTTGACCCGCGCGCATTCTCACCCCTCTGA
26	TACCCCGCGCAACTCAATTTCTCGTGAATTTCCCGCAAT
27	TCGTTATCGGTCCAGGTTGCCCTCTCAGTTTAAGTTTA
28	TTAGTTGAGAGAGAGAGTTATTTGTTCCCTGTTGGTTCTGG
29	TCCCGATCCCTTTGTGTATAGTGCTTTCCTGGGCCTCCCT

ANHANG

31	TCATGATTTGGTATATTTGTTTCGGGGTTATTGGGTAAT
32	TCATTTATAGATTACACTGTCGTATTTGGGCCCGGTTGAT
33	GTACACATCTCTTTTCGTAGGGTAGTTCCCGCCTCTCTCCT
34	AACCCGCTCTCATATATTCTTTCTGCCCCCTTATCGTCC
35	TTGGAGGTCCGTATGATTCAGTTGTTGTATTTACCCGTTT
36	GCATTTTTCCAAGTTCCATGTTAGTCTCCTCTCACTCCAATCCTTGAACAACCTCCC
37	TTGCCTCCCCTGAATGTTTCTTTTCTCTGGAGTCATTTGATGCTGCTTCTCGAG
38	TAGTCGTTTCTGCTTTTCTGTTAGTCTTCTCCGCAATCC
39	TAGCACATTCTCCTGACCTATTCATCTCCCTGTATTTCGGG
40	TTGGTCTAGACCCCTACATCCCCTCTCTCTCCCTGAACA
42	AAGAAGGTCCCCACGTTTAGAGTCATGCTAGTAGCGATCT
43	ATAAGTCGGAACGAGGAGTAGTTTGTGAGGTATATGGTTA
44	TCCCGGTTTTCTCCTCTCTCATCGATTATTTGCATTTCTA
45	TGGACTCCTGTTTTAATGGTTCGGTGGATGCCTTTGGTTA
46	CCCCCTCTCTCTCCTATTTCGATTCTCGTCTTCTTACA
47	TTTCCGGCTTGGTTATATTCTTTGATGGGTGTTTTACGG
48	TGTTTTCTGTCTTTAATTCCGGGGGTTCTCGTCTGATCA
49	TTTCCGGCTTGGTTATATTCTTTGATGGGTGTTTTACGG
50	TTAGTTTTCATGTCCGACTATATTTGAGTGGTTTTCGGGTTT
51	GTA CTGTTCCCGTCCCTTTCTGTCTCGGCCCTTCTAG
52	CCCTTCTCCTGTAGTTCCCTGTAAATCCTGACTATCTTCC
53	TATCAACTTCGACGTGCAATATACCCGGTTATCCCCCTTA
54	GTGGGGTCCCGTATTGGTTTTATTATTTCCGGCTTCTCT
55	TAAACCGCAATTCCTCCTAACGATTTTCCAATCTCATA
56	GTATCCGGTCTATATGTCCTTTCCCCCTTATGTGTGTAG
57	GCCTCGCCCTCTCTTACCATTGGCTCTCCTCTTCCCCTCT
58	TCCCCACTTCTCCGCATTCTCGTTTTCGCTGTTTCAGTTCC
60	TAGATTCCCGGGCATGGTGATTTTCAGTAGTTGTTTTCTTTT

12.2.3 Embp125

Tab. 68: Oligonukleotidsequenzen nach der Klonierung der letzten SELEX-Runde für das Embp125 Protein. In der Tabelle sind die Sequenzen der randomisierten Bereiche in 5'→3' Richtung dargestellt.

DNA	Sequenz (5'→3')
1	TACTTTTCATTTAATATTGTTTTTAAATTTACATTCACTTAT
66	TATGTGGGTGGGTGGGCGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT
68	TCTAATAATATATCTTCCTTATTCTTTA
69	CGCGGTACATTTGAAGCGATCGTGAATGCGGGTGGGTGGG
70	TACTTTTCATTTAATATTGTTTTTAAATTTACATTCACTTAT
71	TACTTTTCATTTAATATTGTTTTTAAATTTACATTCACTTAT
72	GTACTATATGTCTATTCCCTATTAGTTAATTTATATTCTTA
140_S eq1 145 nt	CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAG GCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT GACGAGCAT
140_S eq2	AAGACGATAGTTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGC TTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCAGCTTCC CGAAGGGAGAAAGGCGGACAG
144	ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT

ANHANG

	TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC AGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTC
160	TTTTTGACTTTGGCCATGTGTTCCGGTGGGATGGCGGGTGG
161	GGTGATCGTTCATAGCCAGGCGTGATGTGGGCGGGTGGG
162	TGTATTTATATTTATTCCTGTTTATCATT
163	AAGAGCGGAGGTTTACTTACACTGTGAGTGGGTGGGTGGG
165	TCGGGTACCCTTGTATCATCGTGTGTGCTGAAGTCTGG
166	TCTAATAATATATCTTCCTTATTCTTTA
166_S eq1	TATGTGGGTGGGTGGGTGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT
169	GGGGTCGGGTGGGTGGGTGTTGCGTCCTTGTTCACACGTA
170B	TATGTGGGTGGGTGGGTGGAAGTGTGAGTTACTTGTGGA
170	AAGAGCGGAGGCTTACTTACACTGTGAGTGGGTGGGCGGG
171	TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT
172	TGTGTGTGGGGGGGTGGTGTGCTGAAGTCAGGGGTGTGATAT
173	GGTGATCGTTCATAGCCAGGCGTGATGTGGGCGGGTGGG
174	TACTTTTCATTTAATATTGTTTTTAATTTACATTCATTAT
175	CATGTGGGTGGGTGGGTGGTTATGCTGAGTCATGCTTGGT
176	CGCGGTACATTTGAAGCGATCGTGAATGCGGGTGGGTGGG
177	TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT
178	GGTGATCGTTCATAGCCAAGCGTGATGTGGGCGGGTGGG
179	TATGTGGGTGGGTGGGTGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT
180	TTTATGACAATGGCCACCTGATCCGTGGGAGGGCGGGTGG
181	TTTATGACAATGGCCAACCTGTACGGTGGGTGGGCGGGTGG
182 25	TTAGTACTGGATATCTTACTCTATA
183 25	TGGATTCGTTATTACTTGTTTTTAT
184 12	TATGTGGGTGGG
185	TATGTGGGTGGGTGGGTGGTTATGCTGAGTCGGCCTTGGT
186	TGGATTCGTGAATATTTGTTTTTGTAGGCCACGGCGCCCTGGACAAAGAATCCAATGGTGCCATGCCG CCATGGGTGGCTGGGCTGCAGGCATGGTGGCGTGATGAAGTTGGGGCTTCTGGTGTCCGGTGTGTG CTGCGGCTCATTGTTACCACTCCCCACCATAACGGAACCATATGGTAAGAAGCATGGGCTGCCTGATG AAGGAAATCCACCAATTAACCTTAGTTGCCTTTACCGCCCTGCCCCCGTCAAGACTGTGACCTGGC AAATC

12.2.4 Embp170

Tab. 69: DNA-Sequenz nach der Klonierung der letzten SELEX-Runde für das Embp170-Protein.
In der Tabelle sind die Sequenzen des randomisierten Bereiches in 5'→3' Richtung dargestellt.

DNA	Sequenz (5'→3')
1C	TGATGGTGTGAAGTGCCTGTGTGTGCTGTGCTGTGTGTGG
2C	TCTCTGACCCACCGCTCCTCCCCACCTCCCTCCCTCCGT
3C	GCCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
4C	TGATGGTGTGAAGTGTGTGTGTGTACTGTGCTGTGTGTGG
5C	GCCCTCCCCGTTACTCCCCCTCCTCTGCACCCCTCCCCTA
6C	GCCTGTCTCTCCTCCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
7C	GCCTGCCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
8C	GACAAGTGTGCGGTGTCTCGAATGTTGGGGGGGGGTG
9C	CCAGGTGATGGTGGTGTGGTTGGGGCATGGATGGCAGGGG
10C	TCATGGTTATGGTGCTAAGTTGATGGGTGTGTGTGTGTGG
11C	GGAACGTCTGTGTGTTGAGTCGTGTGTGTGTCCGTGTGTG
12C	CCCGAGCCTTCCCTCCTCCCCTACTCCCCGCCTCTCCCGG
13C	ACCTGTCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
14C	TCAAGCTCGATCTCTCTCTCGCCCCCTCCTTCTCTCGAC

ANHANG

15C	TGATGGTGTGAGGTGTGTGTGTGCTGTGCTGTGTGTGG
16C	TGCTCCCTCTCTCTGCCCCCTCCATCATCCATCTCCCGG
17C	CACCCTGCCTTCGCTCCCTCCAACCGACCTGACTCTCCCG
18C	TGATGGTGCGAAGTGTGTGTGTGTACTGTGCTGTGTGTGG
19C	GGTTGTGTGTGTTACTGTGTGTGGTTGTGTGGGGTGGT
20C	GTAGTAGCGGTGCGTAGTTGTGCCTGTGGGTGTGGGGCCC
21C	CCCGTCCCGTTGGGCTTGGTGGTGGATGGGACTGTCCGGG
22C	TGATGGTGTGAAGTGTGTGTGTGCTGTGCTGTGTGTGG
23C	TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT
24C	GCCTGTCTCTCCCTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
25C	TCCGTGTGGGCGTTGGGTCTCTGTGTTGGTGTGTGTGAGG
26C	GATAAAATCTGTGTGAACATGTGCTGTGAGGTGGGGGGGG
27C	ACTGGGATATGTGTGCGTGTGTGGGTGCATGGTGTGGGTG
28C	GCCTGCCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC
29C	GCAAGAAGTTTGGCTGTGTGTGGATTGTGTGTGTGGGTGT
30C	ACCGTCAGTGTGTGTCTCAGTGTGTGTGTGGGGGGGCC
1N	CCCTCTCCTCTCCACTCTGATCCCCGCCCCCTCTCGCTATC
2N	CGAACCCCGACATTCGCCCGAACCTCAACCTCTCCCCC
3N	GACTAATCCCTCTCCCCCCCCGCTCTCCCTCCCCGATCCC
4N	TCCTCTCCTCTCCACTCCGATCCCTGCCCTCTCGCTATC
5N	TGCCCCGGCCTTCCCTGTTGACCCCGCTCTCCCAGCAC
6N	CCCTCCGAGCCACACTCACCTCCCTCCTGACCCAGGCC
7N	TTCTCCCTCTCGCCTCCCCCTGCTCTCTCTCTCGGGTC
8N	TCCCAGCACTCTCTCTCCCTCTCCCTGTTCTCCTTTCTC
9N	TCCCACCGACCTCTCCCTCAGCTCCTTTCTCTCCCTGCC
10N	GACTAACCCCTCTCCTCCCCCGCTCTCCCTCCCCGATCCC
11N	TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT
12N	TAGCATCCCTCCTCCCTCCGAACGCTCCCCCTCCCTGATC
13N	TCAGCACAATCTCCTCCTCCTCTCTCCTCTCGTCCCCTCCC
14N	ACAACCTTCTCCGGCTCTTCTCTTCTCGTCCGTCTCCTGTCTCTCCCGCCCTCGA
15N	CCTCTCCTTCTCTCTCTCCCACCTCTCCTTCTCTCTCTCCTACCTCTC
16N	ACAACCTTCTCCGGCTCTTCTCTTCTCGTCCGTCTCCTGTCTCTCCCGCCCTCGA
17N	TTAGCACAATCTCCTCCTCCTCTCTCCTCTCGTCCCCTCCC
18N	ACAACCTTCTCCGGCTTTTCTCTTCTCGTCCGTCTCCTGTCTCTCCCCTCCCTCGA
19N	TGAATGGTGTCTTTAGTGAATAGTTGGGGGGGGGGGGGGC
20N	GACTAATCCCTCCCTCCCCCGCTCTCCCTCCCCGATCCC
21N	TTAGCACAATCTCCTCCTCCTCTCTCCTCTCGTCCCCTCCC
22N	TGTGGGGGGGTGGGTGGCGCTGACGGAGGGCTGTGATAT
23N	GACTAATCCCTCTCCTCCCCCGCTCTCCCTCCCTGATCCC
25N	CTAGCACAATCCCTCCTCCTCTCTCCTCTCGTCCCCTCCC
26N	TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT
27N	AGCACCTCTCTCGTTCGGCATCTCCTCCCCCCCCCCTA
28N	TCCTCCGCCTCCTCGCACGTTCTCTTCGCTCACTTCCCC
29N	TGACTGTAGTACTATTCTTGACCAATGGAGGGTGGGGGGG
30N	TCCTCTCCTCTCCACTCCGATCCCTGCCTCTCTCGCTATC
32N	TCGTCAGTTAAATAGTGGGTGGGTGGTAGGATGGGGAAGG
33N	GCCGCCCTCGAACTTCTCGCCTCTCTCTCCCTTCCCTT

12.3 Analyse der DNA-Pools

12.3.1 CD24

```

CD24_1 AAATAACA AGAAAC -C AAATTCGCAC ATCACCATA ACAT
CD24_34 TTAACC AAGCAACAAC AACTAATTAG AACACACATA CCA
CD24_7 CGACT AACACACAA GATACGAACC TTTGCATTAG AACCC
CD24_43 ATCAAAA AAACAATCAC GGAATGGACC CACTCAACTG TTA
CD24_39 TCAACA AAATAAGCAC AAATAAAAA AACGCACCAT AAAA
CD24_40 CGATCA AATCGAGCAC CAAAAAACA GTGACTTCAC CATTG
CD24_35 TCAACC AGAGACACCA AAAAAAGGAC CAAAGAATAA CAA
CD24_68 ACAGCA AAAACAACAC TGTAGATGAA TCCGGACAAA CCCT
CD24_19 ACAACA AAAAATGAAT AAAACAAAAG ATTCAACAC TCA
CD24_48 ACAATCC ACAAAATTAAC ACAACAGGGC GGAACACTTC TCA
CD24_30 TAAAAACA TATAACTGAC AAACCAAAAT GCGCCAACTC AC
CD24_64 TAAACAA AACCAATTGAA CAACAAAAAC ATTTGCGAAC ACA
CD24_57 CAACAA AAAAAAGGAA CATCAACTGC TTAACACGAA TCA
CD24_74 ACACCAA ACAATCCGAA CAAGAAAAG AACTGGAACC TCT
CD24_44 ACAAAAG AACTGCTCAC AAACGAATAT AGACCTATTT CCC
CD24_59 TACAACAA AACA-CAAT AAACGAATAG AAACCAACAG TAT
CD24_32 TCAAC CCATCCTAAC CACAAAAGTA GACATTGACG CCATC
CD24_45 CAATC CAACATTAC CGAAGACGGG CACACTCAAT ACGT
CD24_26 AAAAA GCAAAATGAC CGAAGGATCT CACATACGGC ACTAC
CD24_10 AAGAAAA AGAAACACAC ATCAAAACAC AAAATTTAAT TA
CD24_31 CAAAACGA AAAAAACAA GACGAAATAG CCTGATTATT AC
CD24_23 TAAACCA AAAAAACAAA TGACATTCA GATCGCTCTA G
CD24_46 TTAACAA AGGCACAAAC AGCAACTCAA GATCCTTCTA AG
CD24_62 GTAACGAC AAAAGCATGA AGCACAGAAC AAACCCACTT CG
CD24_18 ACACAGAAA ACA--AACTA CATAACTGAA GAATCACTCA TCA
CD24_50 ACACAGCCT GCA--CATCA AAGAAGTTAC AAAACACACA CCC
CD24_9 CCTACGCCA ACA--ATCAA AAAAAACAAA CAAAAATAA ACA
CD24_20 TAAACCT GAAAAACAC AAAAAACACC AGAATACGCA TAA
CD24_67 ACAAAAACT CCATAAAC-C GAAAACCTGCC AAAACACTCA AA
CD24_22 TCAGCAA ACAGAGAAC AAAAACTGCC ---CACAA ACTAA
CD24_24 AGAGA AAAAATCAGA ACCAAAAACC AAAACCCGGC ACTAA
CD24_65 TTAAGAAA CCAAGCTTC GAAACTGACC AGATCCACC CC
CD24_8 TCTTAACG AATAACAAG AATAA--CGC GAACGACCTC CTCA
CD24_25 TTCTCACA AAACACGGAA CGAAC--AAC AAACGTCACT CTAT
CD24_17 TTAAG AAACAAGAA TAAACATCAC GATCGGCAAC TCGA
CD24_54 TTAAG AAACAAGAA TAAACATCAC GATCGGCAAC TCGA
CD24_47 TAGCCAAA GAAGCATCAA TCAACTGCA- GAACGACTCC A
CD24_41 CTCAAA GCAAACCAA ATAAAAAGA ATGAAAGAGG AGAA
CD24_69 GTCACATA TTGAGCCAAA TAAACGCAT CACAAAAAGG AA
CD24_61 CAAAAG ATGACCCTTT AAAAAACCAG CA-ACGGCGA ATAA
CD24_27 TAAAAG ACGAACAGGA GGCTGACAAC AGAACAAATGT CCAG
CD24_56 CTAAGG CCAACATCA TACT-ACAAA AAAACTCATG AAGG
CD24_33 CCCCACAA CCAAGAACAC GACTTACCAC A--TTAATTC ATCC
CD24_52 TAAACAC ACATACCAAC AGCTAACAC A--GGAACTC GGGC
CD24_58 CCAGAAA ACATAAACTC AACATCAAC T--GATAAAC GATCT
CD24_38 GCAACA ACCAAACCCC AACAAAAA ATGGCTAAAC G-TC
CD24_28 TGAACAAAA CATAGCCAAA GCAAAA--AA AGCTTAAACG ACA
CD24_42 GAAGCAAAA TTAACAAGA TCCAAA--TA CGCTCGAAGC CC
CD24_66 ACACACAC AGCAATCAA ACATAAGCAA AGTCT-AAGC GT
CD24_72 ACGACAA AAAAATAATT GAACAAGCAA ACCCTGAAGC GTT
CD24_70 GTAACAACCT TTAGCAGCTA GCAAAA-CAA AACCTTAAGC A
CD24_2 TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGAGT CAGCCTTGCT
CD24_5 TATGTGGGTG GGTGGGTGGT TATGCTGAGT CAGCCTTGCT
CD24_B1au TTTGTACTTG A-TAGTTTCA AATGGGATGG AACACTATCA A
CD24_36 GTACTATATG TCTATTCCTA TTAGTTAATT TATATTCCTA
CD24_63 GTACTATATG TCTATTCCTA TTAGTTAATT TATATTCCTA
CD24_49 GTACTATATG TCTATTCCTA TTAGTTAATT TATATTCCTA
CD24_60 GTACTATATG TCTATTCCTA TT-GTTAATT TATATTCCTA
CD24_6 GAAATCGGTT GTGATCTTTT GTTGTGTTT GTTTCTGTAG G
Consensus .....888.8 8.888...8. .8888..8. .8..C.....
    
```

Abb. 77: Vergleich der 59 DNA-Moleküle nach der letzten SELEX-Runde (12ten) für das CD24-Protein.

Tab. 70: Übersicht der Nucleinsäuren mit Abweichungen in den Längen ihrer randomisierten Bereiche.

Länge des radomisierten Bereiches [nt]	Nummer der Nucleinsäuren
38	22
39	6, 23, 35, 56, 57, 60, 61
41	40, 28

ANHANG

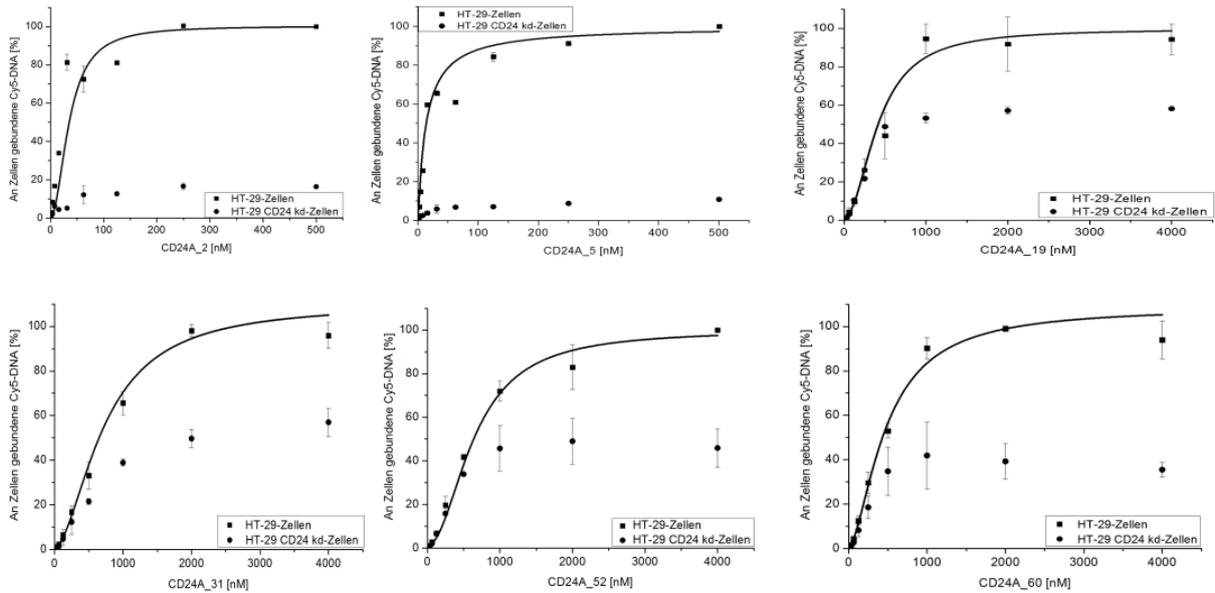


Abb. 78: K_d -Bestimmung für CD24A_2 und andere CD24-Aptamere. Die Zielzellen (Quadrate) und *Knockdown* CD24-Zellen (Punkte) wurden mit einer Verdünnungsreihe von Cy5-markierten Aptameren inkubiert (0.5 bis 500 nM für CD24A_2 und CD24A_5; 32 bis 400 nM für die restlichen vier Aptamere).

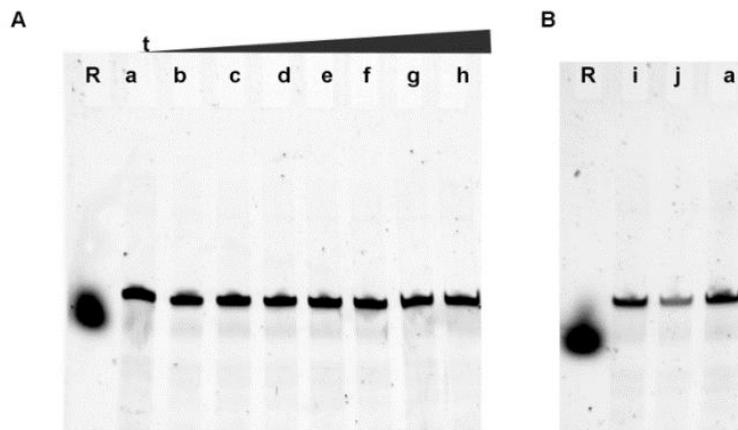


Abb. 79: 10%iges denat. PAA-Gel für den Stabilitätstest des DNA-Aptamers CD24A_2. 40 nmol des Aptamers wurden in RPMI-Medium bei 37 °C in zunehmenden Zeitintervallen (t) inkubiert. Panel A: a: 0 Min.; b: 1 Min.; c: 5 Min.; d: 10 Min.; e: 15 Min.; f: 30 Min.; g: 1 h und h: 4 h sowie Panel B: i: 8 h und j: 24 h. Die Bahnen a (beide Panels) wurden verwendet, um 100% der Volllängen-DNA zu berechnen. Die Spuren R auf beiden Gelbildern stellen den Farbstoff Xylencyanol dar. Dieses wurde als Referenz verwendet, da es die gleiche Emissionswellenlänge wie Cy5 (647 nm) aufweist. Aptamer-Proben wurden in Probenpuffer verdünnt, der keine Verbindung enthielt, die mit der untersuchten Wellenlänge von 647 nm interagieren könnte.

ANHANG

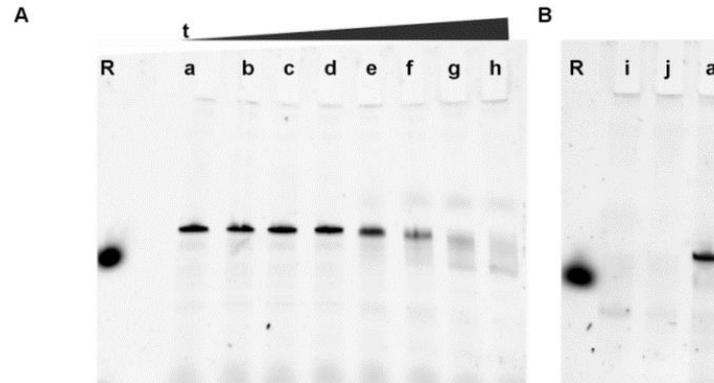


Abb. 80: 10%iges denat. PAA-Gel zur Analyse der Stabilität des CD24A_2-Aptamers. 40 nmol CD24A_2-Aptamer wurden in RPMI-Medium (supplementiert mit 10%igem FKS), bei 37 °C in zunehmenden Zeitintervallen (t) inkubiert. Panel A: a: 0 Min.; b: 1 Min.; c: 5 Min.; d: 10 Min.; e: 15 Min.; f: 30 Min.; g: 1 h und h: 4 h sowie B: i: 8 h und j: 24 h. Die Probenbanden aus Zeitpunkt 0 (die Spur a auf beiden Gelbildern) wurden als 100% Referenz für die DNA in voller Länge verwendet. Die Referenz (R, Xylencyanol) wurde wegen der Emission bei der gleichen Wellenlänge wie der Cy5-Farbstoff (647 nm) verwendet. Durch die Verwendung dieser Referenz, konnte nicht nur die Progression der Elektrophorese, sondern auch die Länge des Aptamers kontrolliert werden. Es wurde schon früher beobachtet, dass in einer 10%igen PAGE unter den gewählten Bedingungen die Xylencyanolbande ein Laufverhalten entsprechend einer DNA mit einer Länge von ca. 50 Nukleotiden zeigt. Die Aptamer-Proben wurden mit einem farblosen Probenpuffer verdünnt.

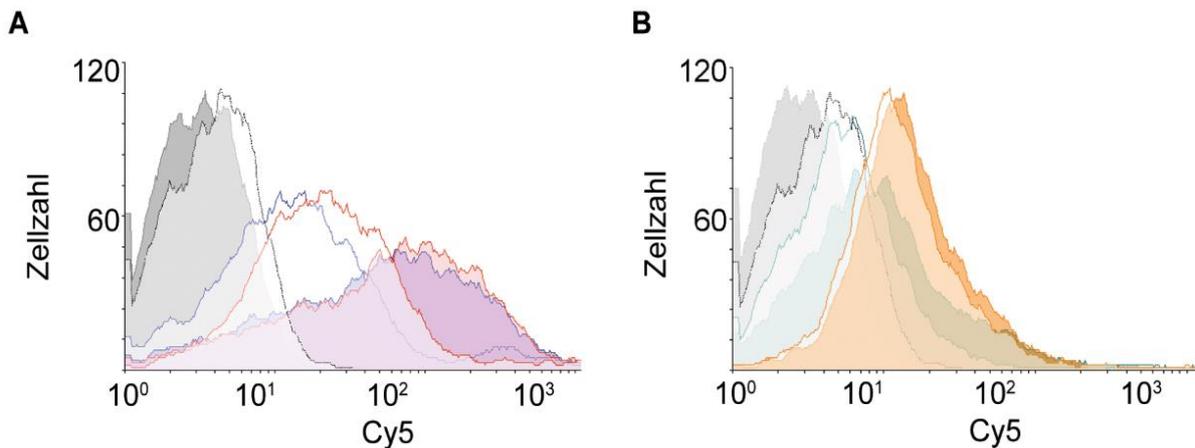


Abb. 81: Die Ergebnisse der Internalisierungsstudien mit dem CD24A_2-Aptamer. Die Zellen wurden zunächst mit dem Aptamer bei 4 °C oder bei 37 °C inkubiert und gewaschen. Danach erfolgte die Behandlung mit DNase bei 37 °C. Als Leerkontrolle wurde die Autofluoreszenz der Zellen bei 4 °C (grau schraffiert) und 37 °C (graue Linie, nicht ausgefüllt) gemessen. Panel A: Bindung des CD24A_2-Aptamers mit den HT-29-Zellen. Blau: Zellen die bei 4 °C inkubiert wurden; rot: Zellen die bei 37 °C inkubiert wurden. Die Histogramme der Proben ohne DNase-Behandlung wurden schraffiert dargestellt, nicht-ausgefüllt: die abgebauten Proben. Panel B: die Internalisierung des Aptamers durch die HT-29 CD24 *Knockdown*-Zellen. Grün: Inkubation bei 4 °C; orange: Inkubation bei 37 °C. Unausgefüllt: mit DNase behandelt; schraffiert: ohne DNase-Behandlung.

12.3.2 CD54 (ICAM-1)

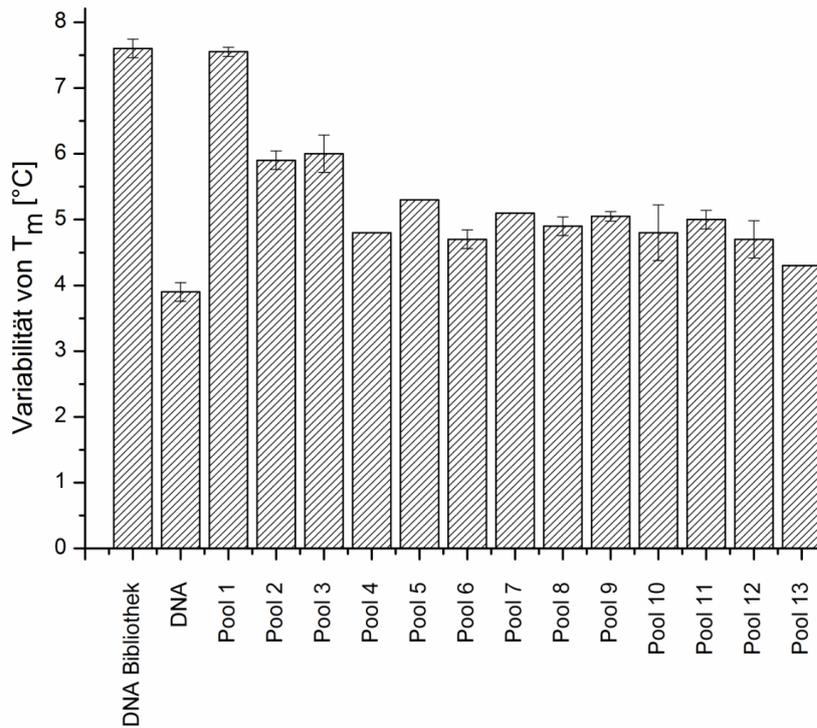


Abb. 82: Ergebnisse der Diversitätsstudien der DNA-Pools nach der SELEX für das ICAM-1-Molekül.

Tab. 71: Abweichende Längen der Nukleinsäuren nach der SELEX für ICAM-1.

Länge des randomisierten Bereiches [nt]	DNA-Nummer (CD54_)	Pool-Anteil [%]
37	18 und 22	4
38	27 und 31	4
39	5, 7, 11, 25, 34, 44, 47, 49 und 54	18
41	1 und 15	4
54	37	2
56	36	2

Tab. 72: Die Sequenzwiederholung.

Sequenz (5'→3')	DNA-Nummer
TTTCCGGCTTGTTATATTCTTTGATGGGTGTTTTACGG	47 und 49

ANHANG

Tab. 73: Übersicht der DNA-Moleküle aus der SELEX für CD54, die GQ ausbilden können, samt der dazugehörigen G-Scores. Mit Hilfe der Software QGRS-Mapper wurden für die 50 Sequenzen die Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung von GQ berechnet. Zwei der Oligonukleotide können gleichzeitig zwei GQ ausbilden (CD54_45 und _7).

G-Score	6	9	10	14	16	17	18	19	20
DNA-Nummer (CD54_)	48; 49	53	12; 22; 51	29; 54	1; 7; 9; 24	23	2; 3; 6; 28; 39; 45; 47	32;	31; 43; 50

	1								64
CD54_12	TCCC	TG-CTCGATT	GCCTTCAAAC	TCGCGGCTCA	TACTATT				
CD54_47	TTTCC	GG-CTTGGTT	ATATTCTTTG	ATGGGTGTTT	TACGG				
CD54_49	TTTCC	GG-CTTGGTT	ATATTCTTTG	ATGGGTGTTT	TACGG				
CD54_60	TAGATTCCC	GGGCATGGTG	ATTTCACTAG	TTGTTTCTTT	T				
CD54_54	GTGGGGTCCC	GTA-TTGGTT	TATTATTTTC	CGGCTTCTCT					
CD54_45	TGGACTCCT	GT--TTTAAT	GGTTCGGTGG	ATGCCTTTGG	TTA				
CD54_56	GTATCCG	GTCTATATGT	CCTTCCCCC	CTTATG-TGT	GTAG				
CD54_18	TGACG	GAC-ATTCTG	GCCTTCTGCC	CTAACGATGT	GTA				
CD54_27	TCGTTATCG	GTCCAGGT-T	GCCCTCTCAG	TTTAAGTTTA					
CD54_7	ATGGATG	GGGTGTTA-G	TGTTTCTGTT	TATAGCGGTT	TAA				
CD54_2	TGTTGGGCC	GGGTGGTC-T	TAGATTGTTA	TCGAGTGATG	GA				
CD54_28	TTAGTTG	AGAGAGAGAG	TTATTGTTC	--CTGTTGGT	TCTGG				
CD54_43	ATAAGTCG	GAACGAGGAG	TAGTTTGTGA	GGTATATGGT	TA				
CD54_3	CTCCTGAG	GGGTGTTTCA	TTGTTGTAGA	TTCCAAGGGC	TT				
CD54_32	TCATTATA	GATTACACTG	TCGATTTGG	GCCCGGTTGA	T				
CD54_16	TTAAAATCTC	TCTCCGTCC	CTGATTGA-T	GATCTCGGTT	T				
CD54_50	TTAGTTTC	ATGTCCGACT	ATATTGAGT	GGTTTCGGGT	TT				
CD54_35	TTGGAGGTCC	GTATGATTCA	GTTGTGTG-A	TTTACCCGTT	T				
CD54_42	AAGAAGGTCC	CCACGTTTAG	AGTCATGC-T	AGTAGCGATC	T				
CD54_22	GGGTTT	GTATAGTTG	TGTTAGGGGG	CTCCTTCGTT	T				
CD54_31	TCATGATTT	GGTATATTTG	TTC---GGGG	TTATTGGGTA	AT				
CD54_29	TCCCGATCC	CTTTGTGTAT	AGTGCCTTCC	TGGGCTCCCC	T				
CD54_24	TCCCGCTCT	C-TTCTGCA	TCGAACCCCC	TCGTTGGTAT	TA				
CD54_57	GCCTCGCCCT	C-TCTTACCA	TTGGCTCTCC	TCTTCCCCTC	T				
CD54_46	CCCCCTCT	C-TCTCTCCT	ATTCGATTCC	TCGTCTTCTT	ACA				
CD54_34	AACCCGCTCT	CATATATTCT	TTCTGCCCC	TTATCGTCC					
CD54_38	TAGTCGTTCC	TGCTTTTCT	GTTAGCTTC	TCCGCAATCC					
CD54_52	CCCTTCTCT	TGTAGTTCT	GTAATCCTG	ACTATCTCC					
CD54_21	GAACCCCGC-	--CCTGTGT	TCTAGTCTG	TTACCCCTTT	TGT				
CD54_26	TACCCCGCG	CAACTCAATT	TCTCGTGAAT	TTCCCGCAAT					
CD54_33	GTACACATCT	CTTTCGTAGG	GTAGTCCCG	CCTCTCTCT					
CD54_53	TATCAACT	TCGACGTGCA	ATA-TACCCG	GTTATCCCC	TTA				
CD54_25	TCATTCC	CCTGTTGACC	C--GCGCGCA	TTCTCACCT	CTGA				
CD54_55	TAAACC	GCAATTCCT	CCTTAACGAT	TTTCCAATCT	CATA				
CD54_14	TAGGT	CTCGTAGCCG	GCATTTTCAA	TTACCCGCT	TATCC				
CD54_40	TTGGT	CTAGACCCCT	ACATCCCACT	CTCTCTCCCT	GAACA				
CD54_48	TGTTT	CTTGTCTTTA	ATTCGGGGG	TTCTCGTTCT	GATCA				
CD54_17	TCC	CGTTAAACC	CTCGCCTTCA	CTTCTCAGA	TATGACT				
CD54_15	CATC	CACTTCCCC	TTAACCTGCT	GTATTCCCGA	TAACTTG				
CD54_5	TTTAGACT	CCGACCCCTG	TTC-GTCTCC	TGATCCCTCT	CA				
CD54_51	GTACTGTT	CCCGTCCCTT	TCCTGTCTCG	GCCCCCTTCT	AG				
CD54_39	TAGCACATTC	TCCTGACCTA	TTC-ATCTC-	CCTGATTCTG	GG				
CD54_23	CAATT	CCCGCCTCA	TTC-GTTTCG	CCCATAATCA	GGTTCC				
CD54_1	TTGT	ACAGGGCCCT	CATCACTTCA	TTATTCTGTA	GGTAGTT				
CD54_9	TTGT	AGATATCCTG	AAT-GTAACC	CCCCTCTCC	GGTATTA				
CD54_58		TCCCCA	CT--TCTCC	GCAT-TCTCG	TTTCGCTGT-	---TTCAGTT	CG		
CD54_37		TTGC	C---TCCCCT	GAATGTTTCT	TT-TCTCTGG	AGTCATTTGA	TGCTGCTTCT	CGAG	
CD54_36		GCATTTTTC	CAAGTCCAT	GTTAGTCTCC	TC-TCACTCC	AATCCTTGAA	--CAACTCCC		
CD54_44			TCCCG	GTT--TCTCC	TC-TCTCATC	GATTATT---	---TGCATTT	CTA	
CD54_11			GCCCT	CAAAATCTCC	TCACTCATG	TGCTAAT---	---TTCTTAA		
Consensus	C.t.t.	t.....	t.....				

Abb. 83: Vergleich der randomisierten Bereiche für 50 DNA Moleküle nach der SELEX für das CD54-Protein.

ANHANG

Tab. 74: Darstellung der sich wiederholenden bzw. sehr ähnlichen Sequenzen nach der SELEX für das Embp125-Molekül.

Sequenz des randomisierten Bereiches (5'→3')	DNA-Nummer
CGCGGTACATTTGAAGCGATCGTGAATGCGGGTGGGTGGG	69 und 176
TACTTTCATTTAATATTGTTTTTAATTTACATTCACCTTAT	1, 70, 71 und 174
GGTGATCGTTCTATAGCCGGGCGTGATGTGGGCGGGTGGG	161 und 173
GGTGATCGTTCTATAGCCGG/AAGCGTGATGTGGGCGGGTGGG	161, 173 und 178
TGTGGGTGGGTGGGTGGCGCTGAAGTCAGGGCTGTGATAT	171 und 177
TATGTGGGTGGGTGGGTGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT	166Seq1 und 179
TATGTGGGTGGGTGGGT/CGGTTATGCTGAGTCAGCCTTGCT	166Seq1_177 und 66

Tab. 75: Die Bindungsstudien der DNA-Moleküle, die in dem Pool nach der 17ten SELEX Runde für das Embp125-Protein gefunden wurden.

DNA	Motiv	Gel shift Assay	Filter Bindungsassay	Pull down (radioaktiv)
66	-1/ +2			3.2%
69	-1			2.0%
70	+2			1.80%
72	-2			0.74%
160	-1/ +3	19.4% [1.46 µM]		
161	-1/ +3	24.9%		
163	-1/ -2	28.7%		
169	-1	15.1%		
170B	-1	33.7%		< 0.1%
170	-1/ -2	44% [2.2 µM]		< 0.1%
171	-1	11.5% [2.12 µM]		
172	-1	20.4%		
175	-1/ +2	18.8%	1.104 µM	
178	-1/ +3	23.5%	1.592 µM	< 0.1%
179	-1/ +2			
180	-1/ +3	4.5%		
181	-1/ +3	6.28%		
185	-1/ +2	2.7%	2.376 µM	< 0.1%

12.3.4 Embp170

a) C-SELEX für Embp170

Tab. 76: Sequenzidentische DNA-Moleküle nach der C-SELEX.

Sequenz 5'→3'	E170_C_DNA Nummer
GCCTGCCTCTCCTTCCGCTCTCTCGCTCCCTCGCTCCCC	28 und 7

ANHANG

```

1                                                                 46
E170_C_1  TGATGGTGTG AAGTGCCTGT GTGTGCTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_4  TGATGGTGTG AAGTGTGTGT GTGTACTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_18 TGATGGTGGC AAGTGTGTGT GTGTACTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_15 TGATGGTGTG AGGTGTGTGT GTG--CTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_22 TGATGGTGTG AAGTGTGTGT GTG--CTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_26 GATAAAAT- CTGTGTGAAC ATGTGCTG-T GAGGTGGGGG GGG
E170_C_19  GGTGTG GTGTGTACT GTGTGTGG-T TGTGTGGGGT GGT
E170_C_29  GCAAG AAGTTGGCT GTGTGTGGAT TGTGTGTGTG GGTGT
E170_C_27  ACTGGG ATATGTGTGC GTGTGTGGT GCATGGTGTG GGTG
E170_C_8   GACAAGTGTG CGGTGTCCTC GAATGTTGGG GGGGGGTG
E170_C_23 TGTGGTGGG TGGGTGGCGC TGAAGTCAGG GCTGTGATAT
E170_C_9   CCAGGTGAT GGTGGTGTGG TTGGGGCATG GATGGCAGGG G
E170_C_10 TCATGGTAT  GGTGCTAAG- TTGATGGGTG TGTGTGTGTG G
E170_C_21  CCGTCCC  GTTGGGCTTG GTGGTGGATG GGACTGTCCG GG
E170_C_11  GGAACGCTG TGTGTGAG- TCG-TGTGTG TGTCCGTGTG TG
E170_C_25  TCCGTGTG GCGGTGGG- TCTCTGTGT  GGTGTGTGTG AGG
E170_C_20  GTAGT  AGCGGTGCG- TAGTTGTGCC TGTGGGTGTG GGGCCC
E170_C_30  ACC  GTCAGTGTG- TGTCTCAGTG TGTGTGTGGG GGGCCC
E170_C_2   TCTCTGAC- CCCACCGCTC -CTCCCACC TCCCTCCCTC CGT
E170_C_3   GCCTGTCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_6   GCCTGTCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_7   GCCTGCCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_28  GCCTGCCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_13  ACCTGTCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_24  GCCTGTCTCT CCTCCGCTC TCTCGCTCCC TCGCTCCCC
E170_C_5   GCCCTCCC  GTTACTCCC  CTCCTTGCA  CCCTTCCCT  A
E170_C_16  TGCTCCCT  CTCTCTGCC  CCCTCCATCA TCCATCTCC  GG
E170_C_12  CCCGAGCC  TTCCCTCCT  CCCTACTCC  CGCTCTCC  GG
E170_C_17  CACCCGCC  TTCGCTCCT  CCAACCGACC TGACTCTCC  G
E170_C_14  TCAAGCT  CGATCTCTCT CTCGCCCTC  TCCTTCTCTC GAC
Consensus .....gt... ....gtg.g. .tg....g.. ..tgtgtg.g gg...

```

Abb. 86: Vergleich der 30 DNA-Moleküle nach der C-SELEX für das Embp170-Protein.¹⁶¹

Tab. 77: Abweichende Länge des randomisierten Bereiches der DNA-Moleküle nach C-SELEX.

Länge des randomisierten Bereich [nt]	DNA Nummer
38	E170_C_8, _15, _19, _22; _30

b) N-SELEX für Embp170

```

1                                                                 56
E170_N_1  CCC TCTCTCTCC ACTCTGATCC CCGCCCTCT CGCTATC
E170_N_4  TCC TCTCTCTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGCTATC
E170_N_29 TCC TCTCTCTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGCTATC
E170_N_2  CG AACCCCGAC ATTCCC---- CCGAACCTCA ACCTCTCCCC CC
E170_N_26 AG CACCCTC-TC TGCTTC---- CCGCATCTCC TCCCCCCCC CCTA
E170_N_9  TCCCCA CCGAC----C TCTCCC--T CAGCTCCTTT CTCTCCCTGC C
E170_N_14 ACAACCTTCT CCGGCTTTC TCTTCTGTC CGTCTCTGT CTCTCCGCC CCTCGA
E170_N_16 ACAACCTTCT CCGGCTTTC TCTTCTGTC CGTCTCTGT CTCTCCGCC CCTCGA
E170_N_18 ACAACCTTCT CCGGCTTTC TCTTCTGTC CGTCTCTGT CTCTCCGCC CCTCGA
E170_N_15 CCTCT  CCTTCTCT-C TCTCCCACT  CTCTCTCTCT CTCTCTACC TCTC
E170_N_13 TCAGCA CAATCTC--C TCCTCC--T CT-CTCCTCT CGTCCCCTCC C
E170_N_17 TTAGCA CAATCTC--C TCCTCC--T CT-CTCCTCT CGTCCCCTCC C
E170_N_21 TTAGCA CAATCTC--C TCCTCC--T CT-CTCCTCT CGTCCCCTCC C
E170_N_24 CTAGCA CAATCCC--C TCCTCC--T CT-CTCCTCT CGTCCCCTCC C
E170_N_27 TCCT  CCGCTC--C TCGCAC-GTT CT-CTTCTGT CACTTCC--C CC
E170_N_32 G  CCGCCCC--C TCGAAC--TT CT-CGCTCT CTCTCCCTC CTT
E170_N_8  TCCCAGCACT CTCTCTCCC TCTCCC--T GTTCTCCTTT CTC
E170_N_5  TGCCCCGGC -CTTCCCTGT TGACCCCCCG CTCTCCCAGC AC
E170_N_3  GAC TAATCCCTCT CCCCCC--- C-GCT-CTCC CTCCCCGATC CC
E170_N_10 GAC TAACCCCTCT CTTCCC--- C-GCT-CTCC CTCCCCGATC CC
E170_N_20 GAC TAATCCCTCT CTTCCC--- C-GCT-CTCC CTCCCCGATC CC
E170_N_23 GAC TAATCCCTCT CTTCCC--- C-GCT-CTCC CTCCCCGATC CC
E170_N_12 TA GCATCCCTCC TCCCTCCGAA C-GCT-CCCC CTCCCTGATC
E170_N_7  T TCCTCCCTCT CGCTCCCC  CTGCT-CTCT CTCTCGGGTC
E170_N_6  CCCTCCGAGC CCACACTCAC CCTCC-CTCC TGACCCAGGC C
E170_N_11 TGTGGGTG GGTGGGTGGC GCTGAAGTCA GGGCTGTGAT AT
E170_N_25 TGTGGGTG GGTGGGTGGC GCTGAAGTCA GGGCTGTGAT AT
E170_N_22 TGTGGGGG GGTGGGTGGC GCTGACGG-A GGGCTGTGAT AT
E170_N_19 TGAATG-- GTGCTCTTAG TGAATAGTTG GGGGGGGGGG CGGGG
E170_N_28 TGACTGTA GTACTATTCT TGACCAATGG AGGGTGGGGG GG
E170_N_30 TTATCG GTTACCAGAG TCTTGAGCAG --GGTGGGG GTGGCA
E170_N_31 TCGTCA GTTAAATAGT GGGTGGGTGG TAGGATGGGG AAGG
Consensus .....c.c.c.c tctccc.... c.gct.ctct etc.c....c ....

```

Abb. 87: Vergleich der 32 DNA-Moleküle nach der N-SELEX für das Embp170-Protein.¹⁶¹

ANHANG

Tab. 78: Abweichende Längen des randomisierten Bereichs nach N-SELEX.

Länge des randomisierten Bereichs [nt]	DNA-Nummer
39	170_N_22
41	170_N_13; 170_N_17; 170_N_19; 170_N_21; 170_N_25 und 170_N_27
48	170_N_15
56	170_N_14; 170_N_16 und 170_N_18

12.3.4.1 NGS

a) C-SELEX

```

1                                     46
C_R5_rev_6 GCCTGTCTC TCCCTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_7 GCCTGTCTC TCCCTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_24 GCCTGTCTC TCCCTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCCTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_3 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_6 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_8 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_3 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_9 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCACTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCACTCC CCC
C_R5_rev_9 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_1 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R10_rev_ GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_6 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_7 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_28 GCCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
E170_C_13 ACCTGTCTC TCCTTCC-GC TCTCTCGCTC C-CTCGCTCC CCC
C_R5_rev_4 CCCGAGCC TCTCCTC--C TCTCTACTC C-CCGCTCC CCCG
C_R10_rev_ CCCGAGCC TCTCCTC--C TCTCTACTC C-CCGCTCC CCCG
E170_C_12 CCCGAGCC TTCCCTC--C TCCCTACTC C-CCGCTCC CCCG
E170_C_17 CACCCGTCC TTCGCTC-CC TC-CAACCGA C-CTGACTCT CCCG
C_R5_rev_5 CGCTCTC TGACCCC-CC TCACTCCCTC CACGCTCCCG GCCC
C_R10_rev_ CGCTCTC TGACCCC-CC TCACTCCCTC CACGCTCCCG GCCC
C_R10_rev_ CGCTCTC TGACCCC-CC TCACTCCCTC CACGCTCCCG GCCC
C_R10_rev_ CGCTCTC TGACCCC-CC TCACTCCCTC CACGCTCCCG GCCC
C_R5_rev_6 TCTC TGACCCCACC GCTCTTCTC ACCTCCCTCC CTCGGT
C_R5_rev_6 TCTC TGACCCCACC GCTCTTCTC ACCTCCCTCC CTCGGT
C_R10_rev_ TCTC TGACCCCACC GCTCTTCTC ACCTCCCTCC CTCGGT
E170_C_2 TCTC TGACCCCACC GCTCTTCTC ACCTCCCTCC CTCGGT
C_R5_rev_1 GTGCCG GCTCCCTCTC CCGACTCCTC TCTCAACTCC CTC
C_R5_rev_9 GTGCCG GCTCCCTCTC CCGACTCCTC TCTCAACTCC CTC
C_R10_rev_ GTGCCG GCTCCCTCTC CCGACTCCTC TCTCAACTCC CTC
E170_C_14 TCAAGCTC GATCTCTCTC TCGCC-CCTC TC-CTTCTCT CGAC
E170_C_5 GCCCTCCC CGTTACTCCC CCTCCTCTGC ACCCTTCCCC TA
E170_C_16 TGCTCCC TCTCTCTGCC CCCCTCCATC ATCCATCTCC CGG
C_R5_rev_6 CCCCAT CCTCGCTCTC TCGCTTC-TC GATGCTCTCT CGCCT
C_R10_rev_ CCCCAT CCTCGCTCTC TCGCTTC-TC GATGCTCTCT CGCCT
E170_C_1 TGATGGTGTG AAGTGCGTGT GTGTGCTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_4 TGATGGTGTG AAGTGCGTGT GTGTGCTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_18 TGATGGTGTG AAGTGCGTGT GTGTGCTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_15 TGATGGTGTG AGGTGTGTGT GTG--CTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_22 TGATGGTGTG AAGTGCGTGT GTG--CTG-T GCTGTGTGTG G
E170_C_26 GATAAAAT- CTGTGTGAAC ATGTGCTG-T GAGGTGGGGG GGG
E170_C_19 GGTTGT GTGTGTTACT GTGTGTGG-T TGTGTGGGGT GGT
E170_C_29 GCAAG AAGTTTGGCT GTGTGTGGAT TGTGTGTGTG GGTGT
E170_C_27 ACTGGG ATATGTGTGC GTGTGTGGGT GCATGGTGTG GGTG
E170_C_8 GACAAAGTGTG CGGTGTCTC GAATGTTGGG GGGGGGTG
E170_C_23 TGTGGGTGGG TGGGTGGCGC TGAAGTCAGG GCTGTGATAT
E170_C_9 CCAGGTGAT GGTGGTGTGG TTGGGGCATG GATGGCAGGG G
E170_C_10 TCATGGTTAT GGTGCTAAG- TTGATGGGTG TGTGTGTGTG G
E170_C_21 CCCGTCCC GTTGGGCTTG GTGGTGGATG GGAAGTGTCCG GG
E170_C_11 GGAACGTCTG TGTGTGAG- TCG-TGTGTG TGTCCGTGTG TG
E170_C_25 TCCGTGTG GCGGTGGG- TCTCTGTGTG GGTGTGTGTG AGG
E170_C_20 GTAGT AGCGGTGCG- TAGTGTGTGCT TGTGGTGTG GGGCCC
E170_C_30 ACC GTCAGTGTG- TGCTCAGTGTG TGTGTGTGGG GGGCCC
Consensus .....gt.... .....t....c tcg.....t. ...g.g...g g.....

```

Abb. 88: Wiederholte Sequenzen aus der Sequenzierung der fünften und zehnten Runde C-SELEX mittels NGS vs. Runde 12 nach Sanger-Sequenzierung.¹⁶¹

ANHANG

	1		43
C_R5_rev_6	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_7	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCCTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_3	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_6	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_8	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_9	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_9	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R10_rev_	GCCTGTCTC	TCCTTCCGCT	CTCTCGCTCC CTCGCTCCCC C
C_R5_rev_4	CCCGAGCC	TCTCCTC-CT	CTCCTACTCC CCGCTCCCC CGG
C_R10_rev_	CCCGAGCC	TCTCCTC-CT	CTCCTACTCC CCGCTCCCC CGG
C_R5_rev_1	GTGCCGGCTC	CCTCTCCGA	CTCCT-CTCT CAACTCCCTC C
C_R5_rev_9	GTGCCGGCTC	CCTCTCCGA	CTCCT-CTCT CAACTCCCTC C
C_R10_rev_	GTGCCGGCTC	CCTCTCCGA	CTCCT-CTCT CAACTCCCTC C
C_R5_rev_5	CGCTCTCTGA	CCCC-CCTCA	CTCCCTCCAC GCTCCCGGCC C
C_R10_rev_	CGCTCTCTGA	CCCC-CCTCA	CTCCCTCCAC GCTCCCGGCC C
C_R10_rev_	CGCTCTCTGA	CCCC-CCTCA	CTCCCTCCAC GCTCCCGGCC C
C_R10_rev_	CGCTCTCTGA	CCCC-CCTCA	CTCCCTCCAC GCTCCCGGCC C
C_R5_rev_6	TCTCTGA	CCCCACCGCT	TTTCTCACC TCCCTCCCTC CGT
C_R10_rev_	TCTCTGA	CCCCACCGCT	TTTCTCACC TCCCTCCCTC CGT
C_R5_rev_6	TCTCTGA	CCCCACCGCT	TTTCTCACC TCCCTCCCTC CGT
C_R5_rev_6	CCCCATCCTC	GCTCTCTCGC	TTCTCGATGC TCTCTCGCT
C_R10_rev_	CCCCATCCTC	GCTCTCTCGC	TTCTCGATGC TCTCTCGCT
Consensus	.gcccctc..c	cCcc.cc.c.	cTcc.ctcc .c.ccccc c..

Abb. 89: DNA-Moleküle die gleiche Sequenzen aufweisen und sowohl in dem Pool der Runde 5 und Runde 10 gefunden wurden.¹⁶¹

ANHANG

c) N-SELEX für Embp170

	1		43
N_R10_rev_		TCCAATACC CTACCTCTAC CTCCCTCC-C TCTCCTCTGC C	
N_R10_rev_		TCCAATACC CTACCTCTAC CTCCCTCC-C TCTCCTCTGC C	
N_R5_rev_6		TCCAATACC CTACCTCTAC CTCCCTCC-C TCTCCTCTGC C	
N_R10_rev_		TCCAATACC CTACCTCTAC CTCCCTCC-C TCTCCTCTGC C	
N_R10_rev_		TTAGCACAAT CTCCTCCT-C CTCTCTCCTC TCGTCCCTC CC	
N_R5_rev_6		TTAGCACAAT CTCCTCCT-C CTCTCTCCTC TCGTCCCTC CC	
N_R10_rev_		TCCCTCGCC CCTCTCCTC CTCTCCCTCG TC-TCTTGGT CA	
N_R5_rev_7		TCCCTCGCC CCTCTCCTC CTCTCCCTCG TC-TCTTGGT CA	
N_R10_rev_		CCCCAATGG CGACTCCTCC CGCTCCCCTC CC-TCTCTGC AC	
N_R5_rev_3		CCCCAATGG CGACTCCTCC CGCTCCCCTC CC-TCTCTGC AC	
N_R5_rev_3		CCCCAATGG CGACTCCTCC CGCTCCCCTC CC-TCTCTGC AC	
N_R10_rev_		TCCCCACCGA CCTCTCTCTC AGCTCCCTTC TC-TCCCTGC C	
N_R5_rev_3		TCCCCACCGA CCTCTCTCTC AGCTCCCTTC TC-TCCCTGC C	
N_R10_rev_		TCCCCACCGA CCTCTCTCTC AGCTCCCTTC TC-TCCCTGC C	
N_R10_rev_		TCCCCACCGA CCTCTCTCTC AGCTCCCTTC TC-TCCCTGC C	
N_R5_rev_6		TCCTCTCC TCTCCACT-C CGATCCCTGC CCTCTCGCT ATC	
N_R5_rev_8		TCCTCTCC TCTCCACT-C CGATCCCTGC CCTCTCGCT ATC	
N_R1_rev_7		TCCTCTCC TCTCCACT-C CGATCCCTGC CCTCTCGCT ATC	
N_R10_rev_		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_8		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_5		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_3		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_2		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_1		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_5		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R1_rev_5		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R1_rev_3		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R1_rev_4		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_6		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R10_rev_		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R5_rev_7		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R10_rev_		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R10_rev_		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
N_R10_rev_		TGTGGGT GGGTGGGTGG CGCTGAAGTC AGGGCTGTGA TAT	
Consensus	t..gt .g.c...T.c CgCTc.c.tC .cg.Ctctg. ...	

Abb. 90: DNA-Sequenzen die nach der N-SELEX in mehreren Pools gefunden wurden.¹⁶¹

ANHANG

	1		56
N_R10_rev_		TCCAATA CCCTACCTCT ACC----TC CCTCCCTCTC CTCTGCC	
N_R10_rev_		TCCAATA CCCTACCTCT ACC----TC CCTCCCTCTC CTCTGCC	
N_R10_rev_		TCCAATA CCCTACCTCT ACC----TC CCTCCCTCTC CTCTGCC	
N_R5_rev_6		TCCAATA CCCTACCTCT ACC----TC CCTCCCTCTC CTCTGCC	
E170_N_3		GACTAAT CCCTCTCCCC CCC---C-GC TCTCCCTCCC CGATCCC	
E170_N_20		GACTAAT CCCTCCCCCTC CCC---C-GC TCTCCCTCCC CGATCCC	
E170_N_10		GACTAAC CCCTCTCCTC CCC---C-GC TCTCCCTCCC CGATCCC	
E170_N_23		GACTAAT CCCTCTCCTC CCC---C-GC TCTCCCTCCC TGATCCC	
E170_N_12		TAGCAT CCCTCTCCTC TCCGAAC-GC TCCCCCTCCC TGATC	
E170_N_7		TTCCT CCCTCTCGCC TCCCCCTGCG TCTCTCTCTC GGGTC	
N_R10_rev_		TTAGCACAAAT CTCTCTCTCC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
N_R5_rev_6		TTAGCACAAAT CTCTCTCTCC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
E170_N_17		TTAGCACAAAT CTCTCTCTCC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
E170_N_21		TTAGCACAAAT CTCTCTCTCC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
E170_N_13		TCAGCACAAAT CTCTCTCTCC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
E170_N_24		CTAGCACAAAT CCCCTCTCTC TCTCTCTCT CTGTCCCTCC C	
E170_N_26		AGCACCCCT CTCTCGTTCC CGCATCTCT CCCCCCCCC CTA	
N_R5_rev_6		TCCT CTCCT-CTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGGTATC	
N_R5_rev_8		TCCT CTCCT-CTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGGTATC	
N_R1_rev_7		TCCT CTCCT-CTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGGTATC	
E170_N_4		TCCT CTCCT-CTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGGTATC	
E170_N_29		TCCT CTCCT-CTCC ACTCCGATCC CTGCCCTCT CGGTATC	
E170_N_1		CCCT CTCCT-CTCC ACTCTGATCC CCGCCCTCT CGGTATC	
N_R10_rev_		TCCCTCGC CCCTCTCCTT CCTCTCCCTC GTCTCTTGGT CA	
N_R5_rev_7		TCCCTCGC CCCTCTCCTT CCTCTCCCTC GTCTCTTGGT CA	
N_R10_rev_		CCCCAATG GCGACTCCTC CCGTCCCTT CCCTCTCTGC AC	
N_R5_rev_3		CCCCAATG GCGACTCCTC CCGTCCCTT CCCTCTCTGC AC	
N_R5_rev_3		CCCCAATG GCGACTCCTC CCGTCCCTT CCCTCTCTGC AC	
N_R10_rev_		TCCCCACCG ACCTCTCTCT CAGTCCCTT CTCTCCCTGC C	
N_R5_rev_3		TCCCCACCG ACCTCTCTCT CAGTCCCTT CTCTCCCTGC C	
N_R10_rev_		TCCCCACCG ACCTCTCTCT CAGTCCCTT CTCTCCCTGC C	
N_R10_rev_		TCCCCACCG ACCTCTCTCT CAGTCCCTT CTCTCCCTGC C	
E170_N_9		TCCCCAGCA CTCTCTCTCC CCTCTCCCTT TTCTCCTTTC TC	
E170_N_6		CCCTCCGAG CCCACACTCA CC-CTCCCTC CTGACCCAGG CC	
E170_N_2		CGAACCCCG ACATTCCCC GAACTCAAC CTCTCCCCC	
E170_N_5		TGCCCCGG CTTCCCTGT TGACCCCGG CTCTCCAGC AC	
E170_N_14		ACAACCTTCT CCGGCTTTC TTTCTCGTC CGTCTCCTGT CTCTCCCGCC CCTCGA	
E170_N_16		ACAACCTTCT CCGGCTTTC TTTCTCGTC CGTCTCCTGT CTCTCCCGCC CCTCGA	
E170_N_18		ACAACCTTCT CCGGCTTTC TTTCTCGTC CGTCTCCTGT CTCTCCCGCC CCTCGA	
E170_N_15		CCTCT CTTCTCT-C TCTCCCACT CTTCTCTCT CTCTCCTACC TCTC	
E170_N_27		TCCT CCGCCTC--C TCG-CACGTT C-TCTCTGCT CACTTCC--C CC	
E170_N_32		G CCGCCCC--C TCG-AAC-TT C-TGCGCTCT CTCTCCCTTC CCTT	
N_R10_rev_		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
E170_N_11		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R10_rev_		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R10_rev_		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R10_rev_		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R10_rev_		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
E170_N_25		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R1_rev_4		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R1_rev_3		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R1_rev_5		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_5		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_1		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_2		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_3		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_5		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_6		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_7		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
N_R5_rev_8		TGT GGGTGGGTGG GTGGCGCTGA AGTCAGGGCT GTGATAT	
E170_N_22		TGT GGGGGGGTGG GTGGCGCTGA CGG-AGGGCT GTGATAT	
E170_N_19		TGA ATG--GTGCT CTTAGTGAAT AGTTGGGGGG GGGGGGGG	
E170_N_28		TGA CTGTAGTACT ATTCTTGACC AATGGAGGGT GGGGGGG	
E170_N_30		T TATCGGTTAC CAGAGTCTTG AGCAG--GGT TGGGGGTGGC A	
E170_N_31		T CGTCAGTTAA ATAGTGGGTG GGTGGTAGGA TGGGGAAGG	
Consensus	t.....t...c.c.c.ct...tc.c.ct ct..... ..	

Abb. 91: Wiederkehrende Sequenzen aus der N-SELEX (4. Runde NGS vs. 12. Runde Sanger).¹⁶¹

12.4 Vektor-Karten

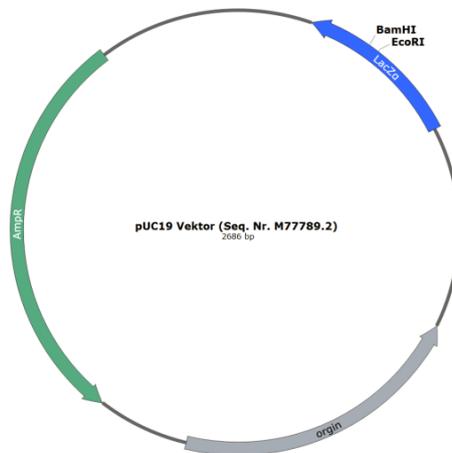


Abb. 92: Darstellung des pUC19-Vektors mit beiden Schnittstellen, die für die Klonierung der DNA nach der Selektion für das Embp125-Molekül genutzt wurden. In der *multiple cloning site* liegt auch das lacZ α -Gen. Über die Expression des Gens kann die Insertion untersucht werden. Zusätzlich trägt das Plasmid Gene, welche für die Ampicillin-Resistenz verantwortlich sind (AmpR).

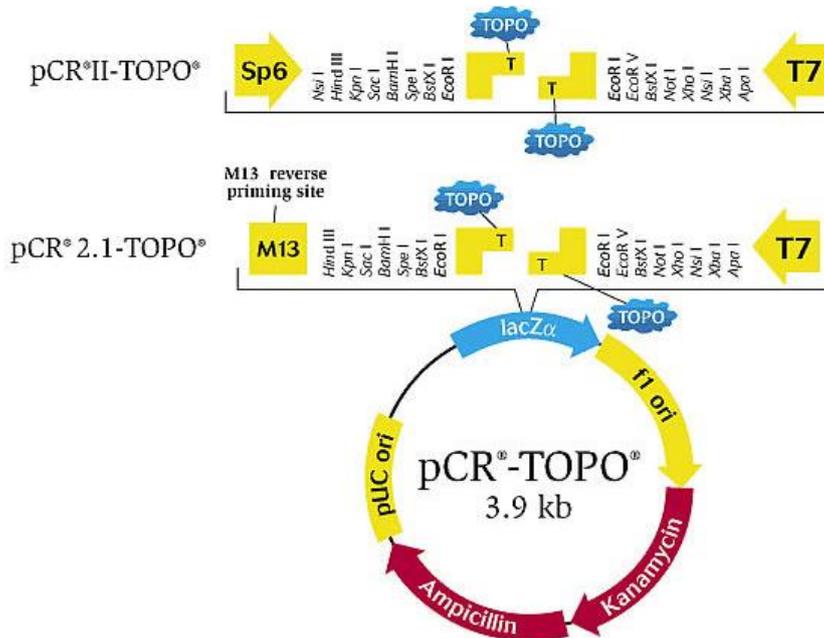


Abb. 93: Die Vektorkarte des pCR-TOPO. In der *multiple cloning site* liegt auch das lacZ α -Gen. Über die Expression des Gens kann die Insertion untersucht werden. Zusätzlich trägt das Plasmid Gene, welche für die Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen verantwortlich sind (AmpR).