

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

„Die Optimierung der Aptamerselektion gegen kleine Moleküle“

Diplomarbeit

vorgelegt von
Kristina Blank

Matr.-Nr. 3914096

August 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Lehrach (Leiter der Abteilung „Vertebrate Genomics“ am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik)
2. Prof. Dr. T. Schmülling (Leiter der Abteilung „Angewandte Genetik“ an der Freien Universität Berlin)



Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Max Planck Institute for Molecular Genetics

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des SELEX- Verfahrens gegen kleine Moleküle. SELEX steht dabei für *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*. Dies ist eine Methode zur *in-vitro* Selektion von Aptameren. Diese kurzen Oligonukleotide werden aus einer Nukleinsäurebank heraus gegen Moleküle selektiert. In einem iterativen Zyklus werden Aptamere generiert, welche die Zielmoleküle spezifisch und mit hoher Affinität binden.

Es sollten, sowohl DNA- als auch RNA-Aptamere gegen Histamin und Folsäure sowie gegen die Phytohormone Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure selektiert werden.

Eindeutige Ergebnisse der DNA-SELEX konnten innerhalb der Zeitspanne dieser Arbeit nicht erreicht werden. Jedoch konnten die angereicherten Nukleinsäuresequenzen der RNA-SELEX mit der SOLEXA-Technologie von Illumina sequenziert werden. Es konnten mögliche Aptamer-Sequenzen für Gibberellinsäure und Histamin identifiziert werden, die spezifisch für ihr Zielmolekül sind und mit großer relativer Häufigkeit in dem Nukleinsäurepool vorkommen. Zusätzlich wurden ebenfalls die Sekundärstrukturen von ausgesuchten Sequenzen mit *mfold* berechnet. Die Strukturen zeigten große Übereinstimmungen. Alle analysierten Sequenzen besitzen Haarnadelstrukturen, mit denen die Zielmoleküle möglicherweise in die Aptamerstruktur integriert werden.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Optimierung der SELEX-Methode. Durch die halbautomatische Durchführung der DNA-SELEX mit dem Magnetpartikelprozessor „KingFisher Flex“ von Thermo Scientific konnte der Zeit- und Arbeitsaufwand minimiert werden. Auch konnte somit eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Durch die Amplifizierung der selektierten Nukleinsäurefragmente der RNA-SELEX mit der RNA-abhängigen Q-Beta RNA-Polymerase war es nicht notwendig, die RNA-Aptamere in cDNA zu transkribieren. Dies wiederum bedeutet die Einsparung zweier enzymatische Schritte und somit ebenfalls eine Zeitersparnis und die Reduktion von möglichen Fehlern während der Transkription.

Das Protokoll der Q-Beta Replikation konnte von vier auf drei Stunden Inkubationszeit verkürzt werden, da festgestellt wurde, dass auch innerhalb von drei Stunden ausreichend RNA repliziert wird. Durch die Reduzierung der Selektionsrunden von 10 bis 15 auf drei, und die verwendete SOLEXA-Sequenzierung, konnte die Dauer der SELEX von 10 bis 45 Tagen auf vier Tage verkürzt werden.

Des Weiteren wurden drei aufeinander folgende Replikationen einer Nukleinsäurebank mit der Q-Beta Replikase durchgeführt. In einem Diversitätsassay dieser Replikationen konnte

gezeigt werden, dass die Q-Beta RNA-Polymerase bestimmte Sequenzen einer Nukleinsäurebank bevorzugt amplifiziert. Dies könnte bedeuten, dass selektierte RNA-Aptamere in der Q-Beta Amplifikation nicht ausreichend repliziert werden und so während der SELEX verloren gehen. Allerdings könnten mit diesem Experiment neue Strukturelemente der RNA gefunden werden, welche zu einer effizienten Q-Beta Replikation führen.

In dieser Arbeit konnten einzelne Arbeitsschritte der SELEX-Methode verkürzt werden. Aufbauend auf die Ergebnisse kann die Selektion von Aptameren mit geringerem Arbeits- und Zeitaufwand durchgeführt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. SELEX	1
1.1.1. Das Selektionsverfahren	1
1.1.2. Die Bindung des Aptamers an das Zielmolekül	3
1.1.3. wichtige Eigenschaften der Zielmoleküle	3
1.1.4. Die Nukleinsäurebank	4
1.1.5. DNA- und RNA-Aptamere	5
1.1.6. Das Separieren der Aptamere	5
1.1.7. Die Automatisierung von SELEX	6
1.1.8. Die Amplifikation der Aptamere	7
1.1.9. Die Analyse der Aptamere	8
1.2. Die Anwendung von Aptameren	11
1.2.1. Aptamere zur Kontrolle der Genexpression	11
1.2.2. Aptamere in der Molekularbiologie und als Biosensoren	14
1.3. SELEX: Die Vor- und Nachteile	15
1.4. Die Q-Beta Replikase	17
1.4.1. Der Aufbau der Q-Beta Replikase	17
1.4.2. Die ungewöhnliche Template-Spezifität	19
1.4.3. Kontaminationen während der Amplifikation	20
1.5. Die Zielmoleküle	22
1.5.1. Die Phytohormone Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure	22
1.5.2. Histamin	23
1.5.3. Folsäure	25
1.6. Ziele dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Geräte	27
2.1.2. Chemikalien und sonstige Lösungen	27
2.1.3. Enzyme und molekularbiologische Kits	29
2.1.4. Oligonukleotide	29
2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese Standard	31
2.1.6. Puffer	31

2.2.	Methoden	33
2.2.1.	DNA und RNA Amplifikation in Emulsion	33
2.2.2.	Polymerasekettenreaktion	34
2.2.3.	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	37
2.2.4.	Synthese doppelsträngiger DNA mit dem Klenow Fragment	39
2.2.5.	T7 Transkription	40
2.2.6.	Q-Beta Replikation	41
2.2.7.	Partikel-Kopplung	42
2.2.8.	SELEX	44
2.2.8.1.	RNA SELEX	44
2.2.8.2.	DNA SELEX	45
2.2.9.	Diversitätsassay	45
2.2.10.	Aufreinigung der DNA- und RNA-Proben	47
2.2.11.	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	48
2.2.12.	Agarosegel-Gelelektrophorese	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	SELEX	50
3.1.1.	RNA-SELEX	50
3.1.2.	DNA-SELEX	54
3.2.	Diversitätsassay	57
3.3.	SOLEXA-Sequenzierung	60
3.4.	Die Optimierung der Q-Beta Replikation	64
3.5.	Diversitätsanalyse der Q-Beta Replikation	67
4.	Diskussion	69
4.1.	SELEX	69
4.1.1.	RNA-SELEX	69
4.1.2.	DNA-SELEX	70
4.2.	Diversitätsassay der SELEX	71
4.3.	Die Sequenzierung	72
4.4.	Die Q-Beta Optimierung	74
4.5.	Diversitätsassay der Q-Beta Replikation	76
4.6.	Ausblick	77
5.	Literaturverzeichnis	78
6.	Anhang	83
6.1.	Protokoll der ersten Selektionsrunde der DNA-SELEX	83
6.2.	Protokoll der Aufreinigung mit dem „KingFisher Flex“	85
	Danksagung	87
	Eidesstattliche Erklärung	88

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytidin-Tri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimide
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'-tetraessigsäure
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM, nM	Molar, Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
MES	2-Morpholinoethansulfonsäuremonohydrat
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
nm	Nanometer
NTPs	Nucleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

TTP	Thymidin-Tri-phosphat
U	Unit
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. SELEX

Als SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) wird eine Methode bezeichnet, in der Nucleinsäuren *in-vitro* gegen Moleküle selektiert werden. Erstmals publiziert wurde dieses Verfahren 1990 von zwei Arbeitsgruppen [Ellington *et al.*, 1990; Tuerk *et al.*, 1990], die das Verfahren unabhängig voneinander entwickelten. Die kurzen Nucleinsäuren wurden von Ellington *et al.* [1990] als Aptamere bezeichnet. Das Wort Aptamer setzt sich zusammen aus dem lateinischen Wort „aptus“ (passend) und dem griechischen Wort „meros“ (Teilchen). Abgeleitet wurde der Name aufgrund der Vielfalt der Zielmoleküle und der spezifischen Bindung der Aptamere an eben diese. Aptamere sind kurze meist 20 bis 60 Nucleotid lange einzelsträngige DNA oder RNA-Oligonucleotide [Fan *et al.*, 2008; Shamah *et al.*, 2008]. Sie werden aus Nucleinsäurebanken isoliert, die eine Diversität von 10^{13} - 10^{15} Molekülen besitzen und binden ihr Zielmolekül sowohl mit hoher Affinität, als auch mit sehr hoher Spezifität. Es wurden bereits für über 150 verschiedene Moleküle Aptamere selektiert. Die Bandbreite reicht dabei von kleinen Molekülen, wie zum Beispiel Ethanolamin, über hochmolekulare Verbindungen, wie Proteine, bis hin zu einzelnen Zellen und Geweben. So vielfältig wie ihre möglichen Bindungspartner sind auch die Anwendungsgebiete. Sie können in der Molekularbiologie als Biosensoren und in der Medizin als Therapeutika und Diagnostika eingesetzt werden [Fang *et al.*, 2010; Shamah *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008].

1.1.1. Das Selektionsverfahren

SELEX beruht auf einen sich wiederholenden und aufeinander aufbauenden Prozess, der aus mehreren einzelnen Schritten besteht (Abbildung 1). Als erstes wird eine Nucleinsäurebank synthetisch hergestellt, die eine Region mit zufällig angeordneten Nucleotiden enthält. Die Oligonucleotide werden mit dem Liganden inkubiert, wobei einige der Nucleinsäuren an diesen binden. Im nächsten Schritt erfolgt die Trennung der gebundenen Nucleinsäurefragmente von den nicht-bindenden. Im Weiteren werden die selektierten Aptamere amplifiziert und aufgereinigt. Die isolierten Binder werden für eine erneute Selektion eingesetzt. In diesem iterativen Zyklus von 6 bis 20 Selektionsrunden werden Aptamere mit einer hohen Affinität zum Zielmolekül selektiert [Fan *et al.*, 2008; Gopinath, 2007; Song *et al.*, 2008].

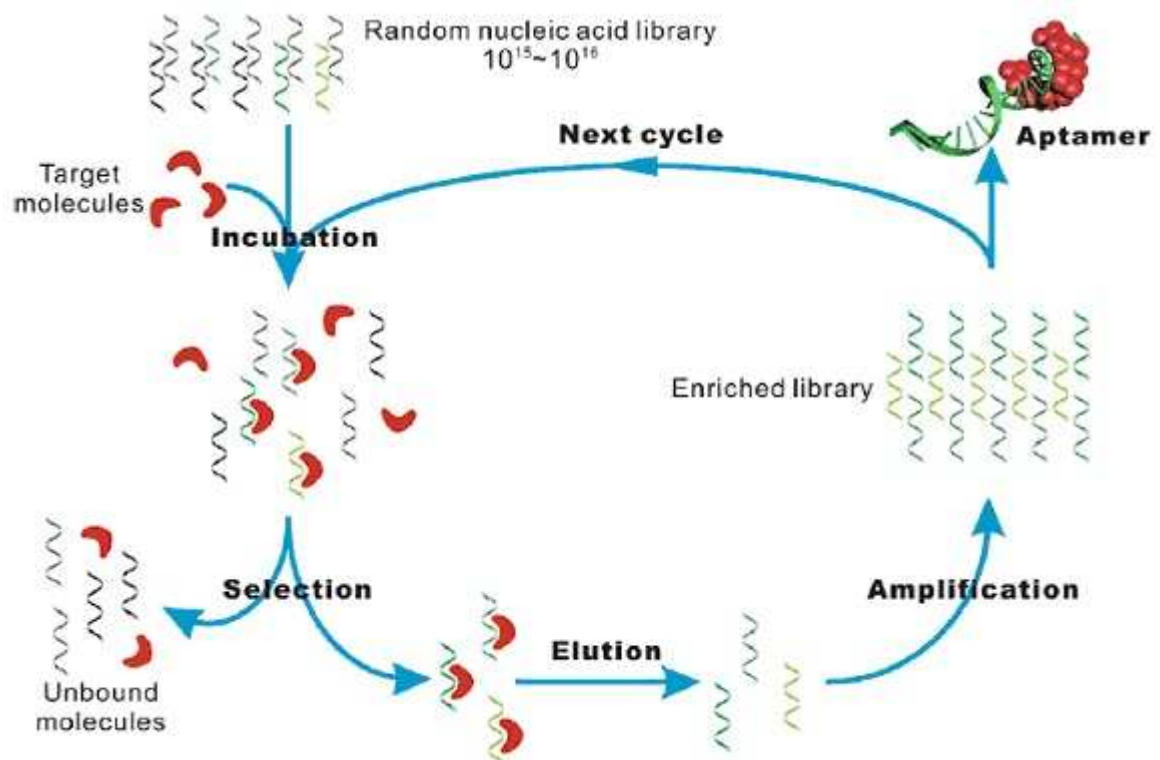


Abbildung 1: Schema des SELEX-Verfahrens. Die Selektion von Aptameren durch iterative Zyklen von Selektion und Amplifikation [Song *et al.*, 2008].

Die Anzahl der Runden ist abhängig von vielen Faktoren. Die Diversität der Nucleinsäurebank, die Affinität der Oligonukleotide zum Zielmolekül, die Eigenschaften des Moleküls und dessen Konzentration, die Stringenz der Selektion, sowie die Amplifikations- und Separationsmethode von bindenden Nucleinsäurefragmenten, beeinflussen die Rundenanzahl [Glökler *et al.*, 2010; Stoltenburg *et al.*, 2007]. In den aufeinander folgenden Selektionen wird die Stringenz erhöht, um hochaffine Aptamere zu erhalten. Dies kann zum Beispiel durch Erhöhung des Reaktionsvolumens, dem Verringern der Targetkonzentration, zusätzlichen Waschschritten, sowie verkürzten Inkubationszeiten und veränderten Pufferbedingungen erreicht werden. Sind die Selektionen abgeschlossen, können die angereicherten Nucleinsäurefragmente analysiert werden. Dies kann durch die Klonierung der einzelnen Sequenzen in Vektoren mit anschließender Sequenzierung erfolgen. Einzelne Aptamerklone werden dann auf ihre Spezifität und Affinität untersucht. Um die Bindungsregionen genauer zu bestimmen, können Mutationen eingeführt werden oder die Aptamere verkürzt werden [Gopinath, 2007, Stoltenburg *et al.*, 2007].

1.1.2. Die Bindung des Aptamers an das Zielmolekül

Aptamere binden ihre Zielmoleküle mit einer pico- bis nanomolaren Affinität und hoher Selektivität aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur [Song *et al.*, 2008]. Sie bilden Schleifen, Auswölbungen, Haarnadelstrukturen, Triplexes und Quadruplexes. In der Abbildung 2 ist die Bildung des Aptamer-Target-Komplexes zu sehen.

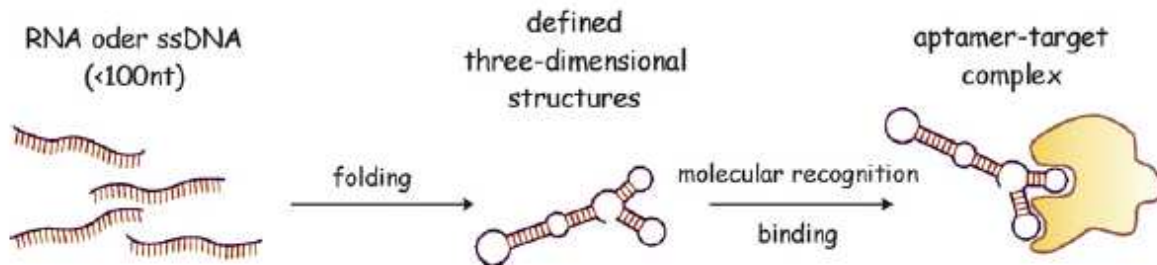


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung an das Zielmolekül. Die Faltung des Aptamers in eine dreidimensionale Struktur führt zur spezifischen Bindung an das Zielmolekül [Stoltenburg *et al.*, 2007].

Die Bindung erfolgt über aromatische Ringe, elektrostatische Anziehungskräfte, van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, und der Kombination dieser Effekte [Stoltenburg *et al.*, 2007]. Durch NMR-Spektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) und Röntgenstrukturanalysen ist es möglich die Tertiärstruktur aufzuklären. Die Analysen zeigen, dass Aptamere kleine Moleküle umfassen oder sich in die Struktur von Makromolekülen integrieren [Famulok, 1999; Song *et al.*, 2008]. So sind sie in der Lage zwischen eng verwandten Molekülen, wie zum Beispiel zwischen Theophyllin und Koffein zu unterscheiden [Klug *et al.*, 1994].

1.1.3. Wichtige Eigenschaften der Zielmoleküle

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche SELEX ist eine gute Löslichkeit und Homogenität des Zielmoleküls. Durch die Immobilisierung an eine Matrix kann die Homogenität sicher gestellt werden [Glökler *et al.*, 2010]. Das Target sollte in ausreichender Menge und mit hoher Reinheit in der Probe vorhanden sein, so werden unspezifische Bindungen minimiert und gleichzeitig die Spezifität erhöht. Die Selektion nach einem bindenden Aptamer wird durch mehrere Faktoren erleichtert. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, werden Liganden, die positiv geladene Gruppen tragen, wie zum Beispiel primäre Aminogruppen, bevorzugt. Positiv wirken sich auch die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und das Vorhandensein von aromatischen Ringen aus. Ist das Zielmolekül negativ geladen und hat einen starken hydrophobischen Charakter (zum Beispiel durch Phosphatgruppen) wird die Selektion erschwert. Bei höhermolekularen Molekülen, wie Proteinen, beeinflussen verschiedene Substrukturen an der Oberfläche die

Bindungseigenschaften. Hier sind Seitenketten von basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin), die oft für Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich sind, zu nennen [Stoltenburg *et al.*, 2007]. Der isoelektrische Punkt von Proteinen kann einen Anhaltspunkt geben, ob die Anreicherung von Aptameren möglich ist. Im Allgemeinen sind Proteine, die unter physiologischen Bedingungen (bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4) positiv geladen sind, gut geeignet für das SELEX-Verfahren [Mayer, 2009].

1.1.4. Die Nukleinsäurebank

Vor der Synthese der Nukleinsäurebank sollten einige Punkte beachtet werden. Die Nukleinsäurebanken bestehen aus einer Region mit zufällig angeordneten Nukleotiden und zwei flankierenden konstanten Sequenzen. Die flankierenden Sequenzen sind Primer und können unter anderem zur Amplifikation und zur *in-vitro* Transkription genutzt werden [Hall *et al.*, 2009; Sampson, 2003]. Die Länge der randomisierten Region liegt bei dem Großteil der *in-vitro* Selektionen zwischen 20 und 80 Nukleotiden. Kürzere Nukleinsäurebanken sind weniger kostenintensiv als längere und die generierten Aptamere sind einfacher zu analysieren. Des Weiteren können die Oligonukleotide, die zum Beispiel länger als 90 Nukleotide sind, während der Vervielfältigung untereinander aggregieren und in der folgenden *in-vitro* Selektion verloren gehen. Ein Vorteil von Nukleinsäurebanken mit einem längeren randomisierten Abschnitt ist die größere strukturelle Komplexität. Diese wird eingesetzt bei Targets von denen nicht bekannt ist, dass sie mit Nukleinsäuren interagieren oder auch zur Untersuchung von komplexen Funktionen. [Hall *et al.*, 2009, Stoltenburg *et al.*, 2007]. Auch partiell randomisierte Banken finden im SELEX-Verfahren Anwendung, zum Beispiel um eine bekannte Bindungsstelle weiter zu analysieren oder um Aptamere zu selektieren, die bei der Bindung an das Zielmolekül ihre Struktur ändern. Nutiu *et al.* [2005] synthetisierten eine Bank mit zwei zufällig angeordneten Abschnitten (10 und 20 Nukleotide) und einer dazwischen liegenden 15 Nukleotid langen Sequenz. Durch die mittlere Sequenz wurden die Oligonukleotide an mit Avidin überzogene magnetische Partikel hybridisiert. Aptamere, die das Target banden und ihre Struktur änderten, lösten sich von der Matrix und konnten analysiert werden.

Die für SELEX eingesetzten Nukleinsäurebanken besitzen eine Diversität von bis zu 10^{16} verschiedenen Molekülen. Die Komplexität der Banken berechnet sich aus y^N , wobei N die Anzahl der randomisierten Nukleotide und y die Anzahl der möglichen Nukleotide darstellt. Ein Nukleinsäurepool, bestehend aus einer 20 Nukleotid umspannenden randomisierten Region, besitzt somit 10^{11} verschiedene Moleküle. Aufgrund dieser hohen Diversität ist es möglich für nahezu jedes Molekül ein hochaffines Aptamer zu generieren [Nelson *et al.*, 2009; Rhodes *et al.*, 2000].

1.1.5. DNA- und RNA-Aptamere

SELEX kann mit DNA- oder RNA-Nukleinsäurebanken durchgeführt werden. Für eine RNA-SELEX wird zuerst die DNA-Bank in RNA mit Hilfe einer RNA-Polymerase umgeschrieben. Nach der Inkubation mit dem Zielmolekül erfolgt die Reverse-Transkription zu cDNA. Um eine erneute Selektionsrunde anzuschließen, wird die cDNA wieder in RNA umgeschrieben. Viele enzymatische Schritte bergen dabei das Risiko aufgrund der Effektivität der Polymerase einige Moleküle und somit mögliche Aptamere zu verlieren, sowie auch ungewollte Mutationen einzuführen [Stoltenburg *et al.*, 2007].

Der Vorteil bei dem Selektieren von DNA-Aptameren liegt in der einfachen Synthese und der definierten Sekundärstruktur. Dagegen besitzt RNA eine Vielzahl von strukturellen Elementen, die für spezifische Bindungen bereitstehen [Famulok *et al.*, 1994]. RNA ist allerdings aufgrund der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose instabiler und wird leichter von RNasen abgebaut. Dies kann durch den Gebrauch von Spiegelmeren verhindert werden. Dafür wird das Aptamer gegen das Enantiomer vom Zielmolekül selektiert. Von dem gewonnenen RNA-Aptamer wird das Spiegelbild (L-RNA) synthetisiert. Da in der Natur nur D-RNAs vorkommen, kann das Spiegelmer nicht enzymatisch abgebaut werden [Klussmann *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1996]. Auch durch chemische Modifikationen wird RNA resistenter gegen Nukleasen. Modifikationen können auch genutzt werden, um neue Funktionen einzuführen, zum Beispiel zum Optimieren der Bindungsparameter und um Aptamere zur Detektion oder zur Aufreinigung von Molekülen einzusetzen [Stoltenburg *et al.*, 2007].

1.1.6. Das Separieren der Aptamere

Die Separationsmethode von bindenden Aptameren von den nicht-bindenden ist entscheidend für den Erfolg der Selektion. Mehrere Methoden sind dafür geeignet. Das Separieren kann durch Affinitätsflächen, wie zum Beispiel magnetischen Partikeln und Affinitätschromatographie erfolgen. Bei der Affinitätschromatographie wird das Target an das Säulenmaterial gebunden. Allerdings sind hohe Mengen des Zielmoleküls nötig. Bei dem Verwenden von Nitrozellulosefiltern werden dagegen hohe Mengen der Nukleinsäuren gebraucht. Auch Affinitätsmarker, Antikörper und weitere Methoden sind geeignet zur Isolierung [Gopinath, 2007; Fan *et al.*, 2008]. Die Aptamere können vom Zielmolekül durch Denaturierung (Hitzebehandlung) und dem Hinzugeben von Substanzen wie Urea, SDS, EDTA getrennt werden. Eine Affinitätselution oder die Elution mit kompetitiven Bindern ist auch möglich [Stoltenburg *et al.*, 2007]. Zum Reduzieren von unspezifisch gebundenen Nukleinsäurefragmenten, die zum Beispiel an die Wände der Reaktionsgefäße binden, können negativ Selektionen durchgeführt werden oder monovalente Kationen eingesetzt werden [Gopinath, 2007].

1.1.7. Die Automatisierung von SELEX

Die in-vitro Selektionen können je nach Anzahl der Runden sehr zeit- und arbeitsaufwendig sein. Zur Verbesserung dieser Parameter wurde der SELEX-Prozess automatisiert. Über einen Magnetpartikelprozessor und mit Hilfe von magnetischen Teilchen kann die Selektion der Aptamere automatisch durchgeführt werden. Dadurch wird SELEX im Hochdurchsatz ermöglicht. Die Reproduzierbarkeit wird verbessert und die Variabilität der Selektionen wird reduziert. Die Vorteile der Automatisierung sind die Flexibilität, die Vielseitigkeit in Bezug auf die Wahl der Reagenzien und die Möglichkeit für mehrere Targets parallel Aptamere zu selektieren [Cox *et al.*, 1998; Gopinath, 2007; Glökler *et al.*, 2010].

In dieser Arbeit wurde mit dem „KingFisher Flex“ von Thermo Scientific und magnetischen Partikeln gearbeitet (Abbildung 3). Das Gerät ist einfach in der Handhabung und wichtige Parameter (Inkubationszeiten, Temperatur, Mix-Geschwindigkeit, Waschschriffe, Elutionsbedingungen) können leicht eingestellt werden. Des Weiteren wird die Kontamination durch Schwebstoffe reduziert. Selektionen, Amplifikationen und Aufreinigungen können im KingFisher-Gerät durchgeführt werden. Die Mikrotiterplatten bieten Platz für 96 Proben und ermöglichen parallele Selektionen [Glökler *et al.*, 2010].



Abbildung 3: Der Magnetpartikelprozessor „KingFisher Flex“ von Thermo Scientific [Thermo Scientific, Produkt Information].

Die Zielmoleküle werden an die magnetischen Partikel gebunden und aufgrund ihres geringen Durchmessers befinden sich die Liganden mit einer hohen Dichte im Reaktionsvolumen [Glökler *et al.*, 2010]. Da die Partikel zusammen mit den Aptameren in neue Gefäße transferiert werden, werden Oligonukleotide, die unspezifisch an Plastikware binden, entfernt. Dadurch werden auch Kontaminationen reduziert und das vollständige Entfernen der Puffer führt zu reineren Proben [Wochner *et al.*, 2007].

1.1.8. Die Amplifikation der Aptamere

Das SELEX-Verfahren wird auch als *in-vitro* Evolution bezeichnet, da während der Amplifikationen Mutationen in die Nukleinsäurebank eingeführt werden [Glökler *et al.*, 2010]. Die Fehlerrate der Taq DNA-Polymerase liegt bei $8 \cdot 10^{-4}$ Mutationen pro Basenduplikation. Das bedeutet nach 10^6 Amplifikationen werden bei einem 100 Basenpaar langen Nukleinsäurefragment an jeder 0,8 Position ein Nukleotid pro Doppelstrang-DNA falsch eingebaut [Keohavong *et al.*, 1989]. Dabei ist die Fehlerrate abhängig von den Bedingungen während der Amplifikation. Die T7-RNA-Polymerase, welche oft zum Umschreiben der DNA in RNA verwendet wird, besitzt eine Fehlerrate von $0,5 \cdot 10^{-4}$ [Huang *et al.*, 2000]. Durch das Einbringen von Mutationen kann eine höhere Diversität des Nukleinsäurepools erreicht werden.

Für eine erfolgreiche SELEX ist es wichtig, dass jedes Nukleinsäurefragment vervielfältigt wird, sonst könnte ein mögliches hochaffines Aptamer verloren gehen. In dieser Arbeit wurden alle Amplifikationen in Emulsion durchgeführt. Durch das Arbeiten mit Wasser-in-Öl-Emulsion wird die Beeinflussung der PCR durch chimäre Moleküle, Kontaminationen und parasitische Sequenzen reduziert [Glökler *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2003].

Die Amplifikation von Nukleinsäurebanken ist abhängig von zwei Faktoren. Zum einen werden kurze Fragmente bevorzugt amplifiziert und zum anderen können sich Artefakte bilden, die durch Rekombination zwischen homologen Regionen der DNA entstehen. So bilden sich chimäre Moleküle von denen die kürzeren mit einer höheren Amplifikationsrate vervielfältigt werden [Williams *et al.*, 2006]. Auch unspezifische Amplifikationsprodukte werden in einer PCR oft bevorzugt vervielfältigt. Des Weiteren werden bei einer geringen Menge an initialer DNA oft Primer-Dimer produziert, daher nimmt die Spezifität der Amplifikation bei kleineren Mengen an DNA ab. Die wässrigen Tröpfchen in der Emulsion fungieren als abgeschlossene Reaktionsvolumen [Nakano *et al.*, 2003]. Jedes Nukleinsäuremolekül wird zusammen mit den Reagenzien und dem Enzym in einer Blase eingeschlossen und abgetrennt von den anderen Sequenzen amplifiziert, wie in der Abbildung 4 dargestellt. Somit wird verhindert, dass Fragmente mit einer höheren Amplifikationsrate andere verdrängen. Selbst bei dem Auftreten von Kontaminationen oder ungewollten Sequenzen sind diese abgegrenzt von den übrigen Nukleinsäurefragmenten und beeinflussen den Erfolg der Vervielfältigung nur gering. Zu beachten ist, dass bei der Amplifikation in Emulsion geringere Endkonzentrationen erreicht werden.

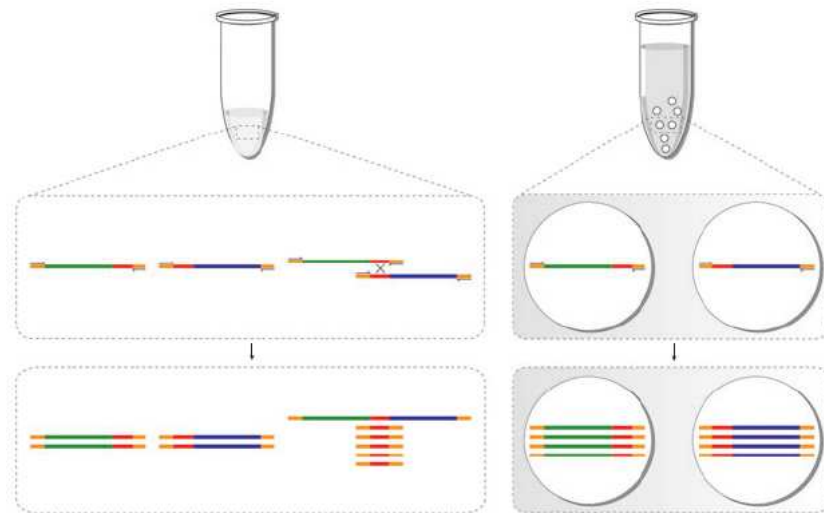


Abbildung 4: Vergleich der Emulsions-PCR mit einer üblichen PCR. Links ist die Entstehung von rekombinanten Sequenzen in einer konventionellen PCR abgebildet, rechts die Emulsions-PCR mit der isolierten Amplifikation der einzelnen Fragmente [Williams *et al.*, 2006].

1.1.9. Die Analyse der Aptamere

Nach dem Abschluss der Selektionen werden die Aptamere charakterisiert. Der Erfolg der SELEX kann durch eine Diversitätsanalyse überprüft werden. Anhand von charakteristischen Rückschmelzkurven kann die Abnahme der Diversität beobachtet werden [Schütze *et al.*, 2010]. Stoltenburg *et al.* [2005] nutzten einzelsträngige DNA, die mit Fluorescein markiert war, um die Anreicherung von Aptameren während der Selektionen beobachten zu können. Diese Methode nannten sie FluMag-SELEX. Auch mit der FLAA-Methode (*fluorescent dye-linked aptamer assay*) kann die Anreicherung von Sequenzen nachgewiesen werden. Das biotinylierte Zielmolekül wird an Streptavidin überzogene Mikrotiterplatten immobilisiert (Abbildung 5). Ein fluoreszierender Farbstoff bindet an einzelsträngige DNA und kann mit einem Spektrofluorometer nachgewiesen werden. Das Target wird mit der Nukleinsäurebank inkubiert und Sequenzen, die nicht binden werden durch einen Waschschrift entfernt. So können die fluoreszierenden Aptamere detektiert werden.

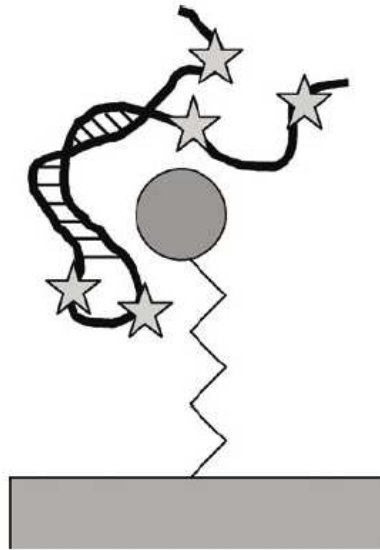


Abbildung 5: Schematische Darstellung der FLAA-Methode. Die Detektion von Aptameren erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff [Wochner *et al.*, 2007].

Der Vorteil in dieser Methode liegt darin, dass im Gegensatz zur FluMag-SELEX die Fluoreszenz-Farbstoffe nicht direkt an die Nukleinsäuren gebunden werden, da dies die Bindungseigenschaften der Aptamere beeinflussen kann. Weiterhin kann durch den Vergleich mit einer Eichkurve die Anreicherung von Sequenzen quantifiziert werden [Wochner *et al.*, 2007].

Zur genauen Analyse der angereicherten Sequenzen wird der finale Nukleinsäurepool in bakterielle Vektoren kloniert. Die einzelnen Kolonien werden sequenziert [Stoltenburg *et al.*, 2007]. In dieser Arbeit wurden die angereicherten Sequenzen nach nur drei Selektionsrunden mit der SOLEXA Technologie von Illumina analysiert. Die Klonierung in Vektoren war nicht nötig. Bei dieser Sequenzierungsmethode werden zuerst Adaptoresequenzen an die Oligonukleotide angefügt (Abbildung 6.A). Diese sind komplementär zu Sequenzen an planaren optischen Oberflächen (*Flow Cells*). Die zu sequenzierende einzelsträngige DNA hybridisiert an die gebundenen Oligonukleotide und wird in einer Festphasen-PCR amplifiziert (Abbildung 6.B). Die gebundenen Oligonukleotide dienen als Primer, und durch den Einsatz einer hoch spezifischen DNA-Polymerase entstehen viele gleiche Sequenzen an einer Stelle (Abbildung 6.C). Im nächsten Schritt werden die DNA-Fragmente denaturiert und der Gegenstrang wird gewaschen. Die Nukleotide zur Analyse sind unterschiedlich fluoreszierend markiert, wobei die 3'Hydroxylgruppe durch den Fluoreszenzfarbstoff chemisch inaktiviert ist. In jedem Syntheseschritt wird so nur ein Nukleotid von der DNA-Polymerase eingebaut (Abbildung 6.D). Nach dem Auslesen der eingebauten Base mittels Fluoreszenz-Mikroskopie folgt ein erneuter Zyklus (Abbildung 6.E und 6.F) [Mardis, 2008].

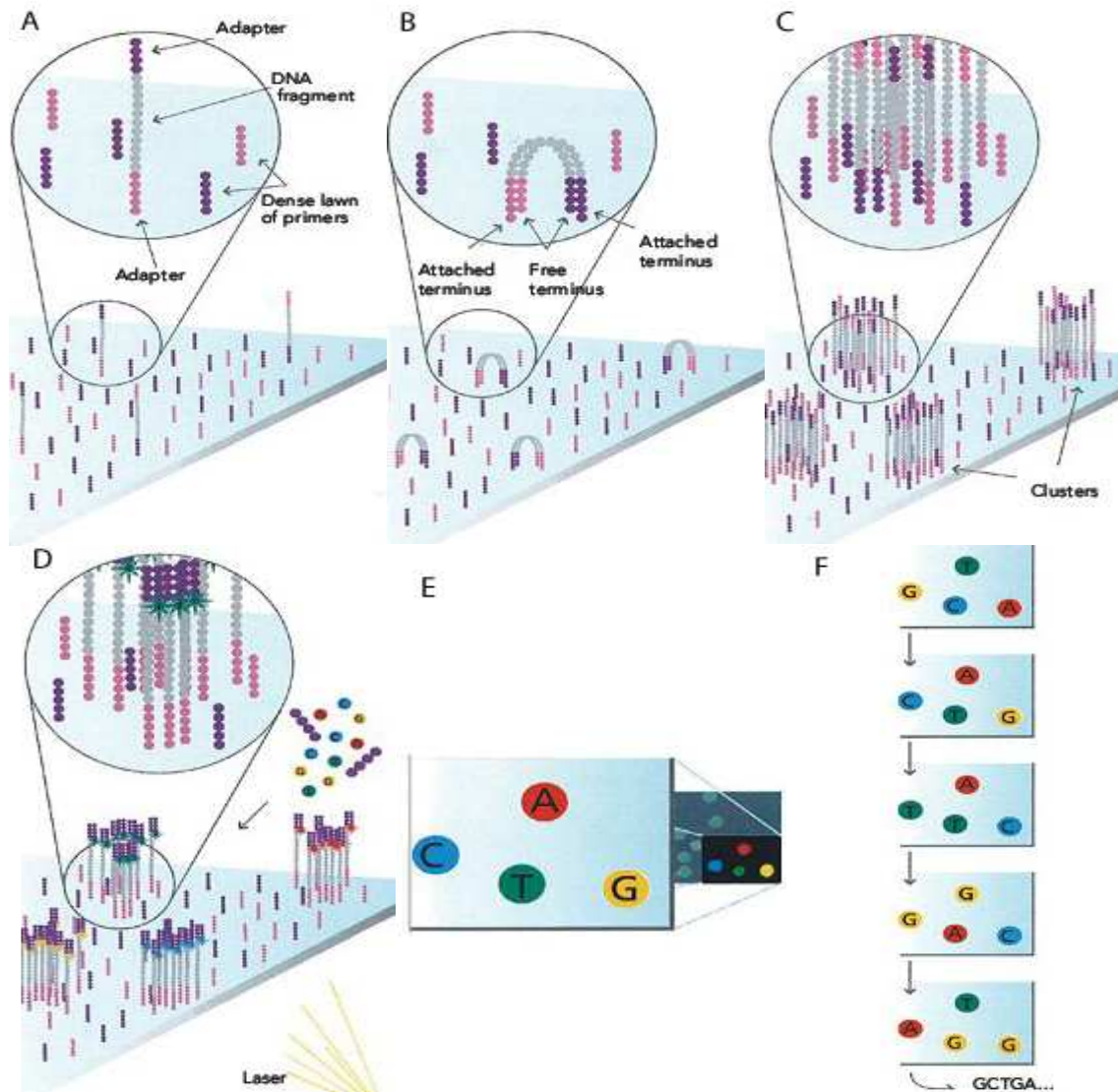


Abbildung 6: SOLEXA-Technologie von Illumina [Illumina, Produkt Information].

Ist die Sequenzierung beendet, folgt eine Computer gestützte Auswertung. Werden konservierte Regionen, die in mehreren Aptameren vorkommen gefunden, sind diese oft an der Bindung mit dem Liganden beteiligt. Auch mögliche Sekundärstrukturen können durch Computerprogramme errechnet werden. Zum Beispiel ermittelt das Programm *mfold* Konformationen von einzelsträngigen Nucleinsäuren ausgehend von dem kleinsten für die Struktur nötigen Energieaufwand. Anhand von NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) oder Röntgenstrukturanalysen kann die drei-dimensionale Struktur aufklärt werden [Stoltenburg *et al.*, 2007]. Die Determination der Affinität und Spezifität des Aptamers erfolgt durch Bindungsassays, wie zum Beispiel durch Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie [Wochner *et al.*, 2008]. Die Dissoziationskonstante (K_D) gibt dabei Aufschluss über die Affinität. Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto stärker ist die Bindung [Lottspeich *et al.*, 2006].

1.2. Die Anwendung von Aptameren

Die Anwendungsgebiete sind so zahlreich wie die möglichen Zielmoleküle. Aptamere können für ein breites Spektrum an Targets generiert werden. Darunter zählen Metallionen, Moleküle wie Ethanolamin (Abbildung 7), Vitamine, Aminosäuren, Cytokine, Enzyme, Immunoglobuline und Pharmazeutika. Auch für Zellfragmente, Bakterien, Viruszellen und menschliche Zelllinien wurden bereits Aptamere hergestellt [Shamah, 2008 *et al.*; Song *et al.*, 2008].

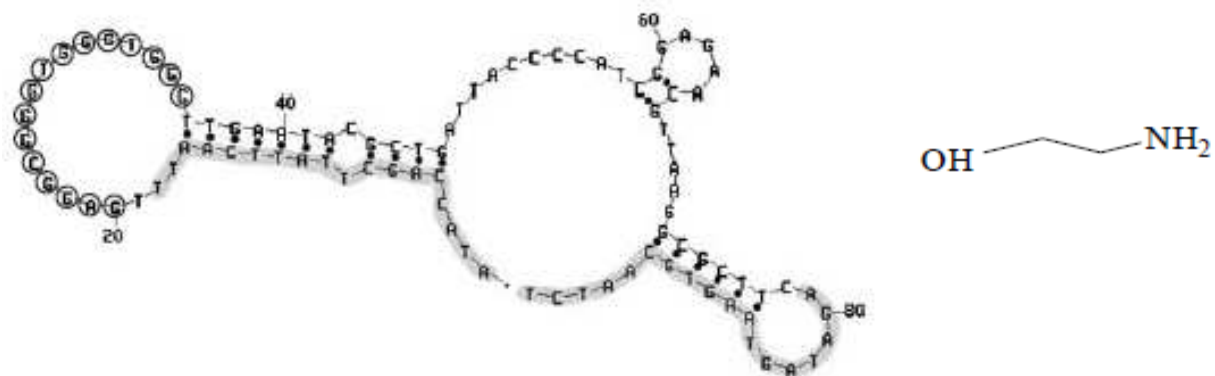


Abbildung 7: Ethanolamin-Aptamer. Sekundärstruktur des Aptamers für Ethanolamin (links) berechnet mit dem Computerprogramm *mfold* und die chemische Struktur von Ethanolamin (rechts) [Mann *et al.*, 2005].

Aptamere, die kleine Moleküle binden, werden unter anderem in der Molekularbiologie eingesetzt. Untersuchungen der Struktur von Aptamer-Molekül-Komplexen werden genutzt, um die molekulare Erkennung und tertiäre Struktur motive von Nucleinsäuren besser zu verstehen. Des Weiteren können sie als Nachweis für oxidative Schädigungen, als Biosensoren und zur Kontrolle der Genexpression dienen [Famulok, 1999].

Holeman *et al.* [1998] stellten Aptamere her die Sulforhodamin B binden. Dies ist ein fluoreszierender Farbstoff und könnte dazu genutzt werden RNA-Transkripte zu markieren und RNA sowohl *in-vivo*, als auch *in-vitro* nachzuweisen. Eine weitere mögliche Anwendung besteht in Aptameren, die mit Antibiotika interagieren und so die Ribosomale Proteinsynthese hemmen [Famulok, 1999]. Auch in der Medizin können Aptamere eingesetzt werden. Als Medikamente und zur Diagnose, sowie auch zur Gentherapie ist die Anwendung denkbar [Famulok *et al.*, 2007].

1.2.1. Aptamere zur Kontrolle der Genexpression

Die funktionelle Genomik untersucht die Funktion von Genen und ihren Produkten. Um die physiologische Rolle von Genprodukten aufzuklären, wird die Genexpression beeinflusst. Werstruck *et al.* [1998] inserierten ein Aptamer in die UTR (5′*untranslated region*) einer mRNA. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe des Liganden die Translation *in-vitro* und *in-vivo* unterdrückt wurde. Aptamere können aber auch Genprodukte inaktivieren ohne das genetische Material zu verändern [Famulok *et al.*, 2000]. Intrazelluläre Aptamere werden als Intramere bezeichnet. Diese RNA-Aptamere können direkt in der Zelle exprimiert werden. Da es möglich ist, Aptamere auch für spezifische Bindungsstellen eines Proteins zu synthetisieren, können sie ihren Bindungspartner gezielt beeinflussen. So können Signaltransduktion, Zellwachstum, Transkription, Translation und virale Replikation inhibiert werden [Famulok *et al.*, 2007].

Eine weitere mögliche Anwendung von Aptameren sind *Riboswitch*. *Riboswitch* sind Abschnitte von mRNAs, die in nicht-kodierenden 5′UTR (untranslated region) Bereichen liegen und evolutionär hoch konserviert sind. Durch die Bindung eines spezifischen Liganden ändern die natürlichen Aptamere ihre Konformation und beeinflussen die Genexpression (Abbildung 8).

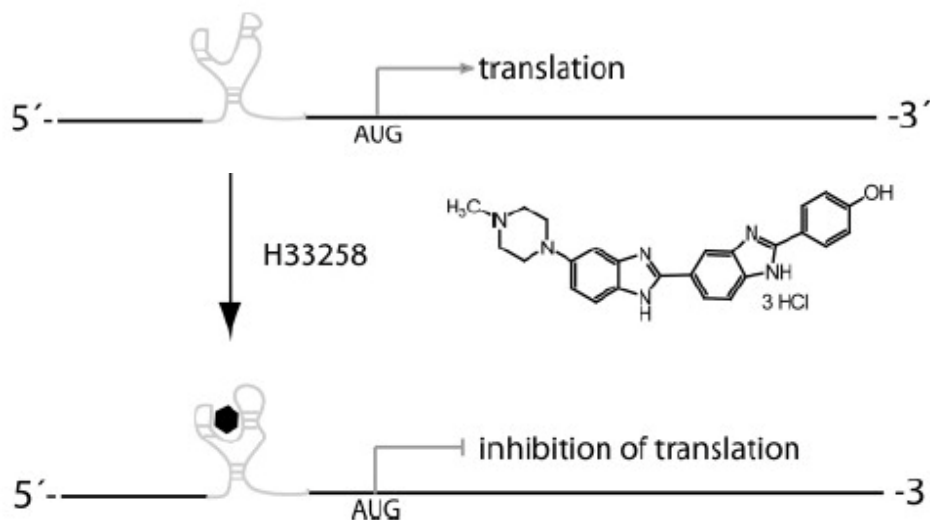


Abbildung 8: Verwendung eines Aptamers als künstlicher *Riboswitch*. Ein durch in-vitro Selektion hergestelltes Aptamer wurde in die 5′UTR eines β -Galaktosidase Expressionplasmids eingeführt. Bei der Bindung des Liganden (Farbstoff Hoechst) wurde die Translation gehemmt [Famulok *et al.*, 2007; Werstruck *et al.*, 1998].

Im Allgemeinen bestehen sie aus zwei funktionellen Domänen. Zum einem aus der Aptamer-Domäne, die für die Bindung des Liganden verantwortlich ist und zum anderem aus der Expressionsplattform (Abbildung 9). Die Expressionsplattform liegt stromabwärts in großer Nähe der Aptamer-Domäne. Die beiden Abschnitte können sich auch überlappen. Die

Expressionsdomäne beeinflusst die Genexpression durch die allosterische Strukturveränderung des *Riboswitch*. Zum Beispiel können die Effizienz der Translationsinitiation, die Transkriptionselongation und weitere Schritte der Genexpression gesteuert werden [Famulok *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2004].

Riboswitch konnten in Prokaryoten, in Archae und in Eukaryoten gefunden werden. Sie regulieren in Bakterien ungefähr drei Prozent der Gene. Auch in höheren Pflanzen konnte dieser Mechanismus zur Regulierung der Genexpression nachgewiesen werden. Thiaminpyrophosphat (TPP) ist ein Cofaktor der für enzymatische Reaktionen gebraucht wird. Die Biosynthese von TPP wird in Prokaryoten und Eukaryoten durch *Riboswitch* reguliert [Croft *et al.*, 2007; Bocobza *et al.*, 2008]. Die *Riboswitch*-Sequenz konnte in der 3'UTR von Thiamin-C-Synthase Genen von Pflanzen gefunden werden und beeinflusst das Splicen der mRNA [Bocobza *et al.*, 2008]. Die Abbildung 9 zeigt mögliche Wege zur Beeinflussung der Genexpression von TPP-*Riboswitch*.

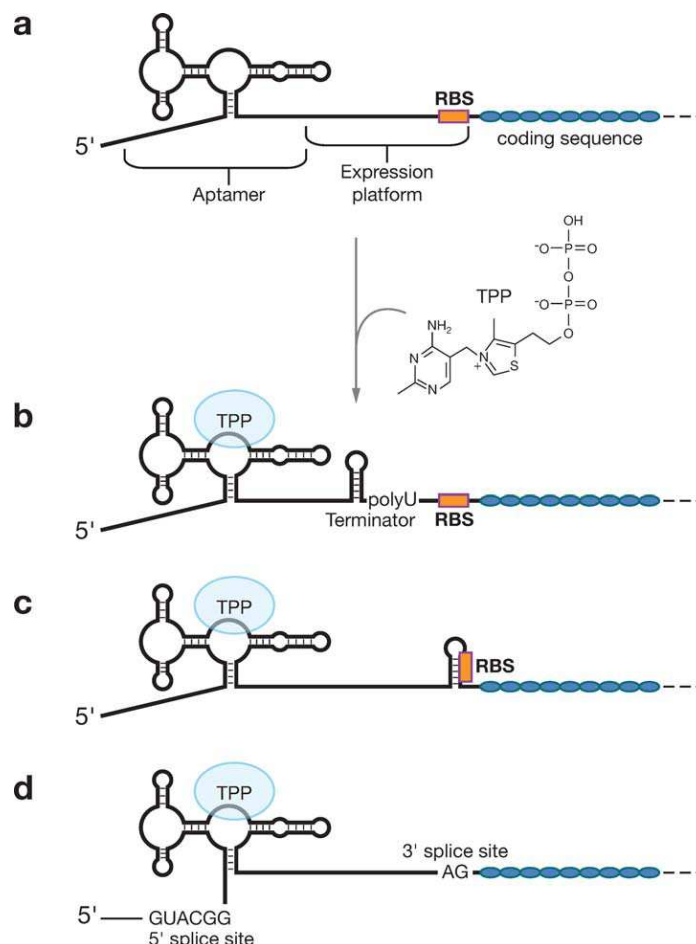


Abbildung 9: Schematische Darstellung des TPP-*Riboswitch*. Gezeigt ist die Beeinflussung der Genexpression (a), die Termination der Transkription (b), die Inhibition der Translation (c) und das alternative Splicen (d) nach dem Binden von TPP [Winkler *et al.*, 2005].

Künstliche *Riboswitch* könnten unter anderem als Biosensoren für Metabolite in Pflanzen genutzt werden [Bocobza *et al.*, 2008].

1.2.2. Aptamere in der Molekularbiologie und als Biosensoren

In der Molekularbiologie können Aptamere zur Immunodetektion von Proteinen, für FACS (*fluorescent activated cell sorter*) Analysen, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), Affinitätschromatographie und in weiteren Methoden eingesetzt werden. Werden Aptamere an Oberflächen gebunden, können sie zur Aufreinigung von Proteinen und anderen Molekülen verwendet werden. Auch das Anfärben von Zellen ist mit fluoreszierend markierten Aptameren möglich, indem sie Oberflächenproteine der Zellen binden. Molekulare Erkennungsmechanismen können durch Strukturanalysen von Aptamer-Protein-Komplexen studiert werden [Famulok *et al.*, 2007].

Eine wichtige Eigenschaft der Aptamere in Bezug auf Biosensoren ist ihre chemische Stabilität und die spezifische Bindung der Zielmoleküle. Auf Aptameren basierende Biosensoren sind wieder verwendbar und zeichnen sich durch eine hohe Sensibilität aus. Da Aptamere nur eine geringe Größe haben können sie auf Materialien mit hoher Dichte immobilisiert werden [Song *et al.*, 2008]. Liu *et al.* [2006] entwickelten einen Teststreifen mit dem Adenosin und Kokain nachgewiesen werden können. Gold-Nanopartikel werden mit den vorher selektierten Aptameren gekoppelt. Bei Zugabe der Liganden ändern die Aptamere ihre Struktur und die Nanopartikel dissoziieren (Abbildung 10). Es kommt zu einem sichtbaren Farbwechsel. Bei einer Konzentration von 0,2mM Kokain im Serum kann eine Farbreaktion festgestellt werden.

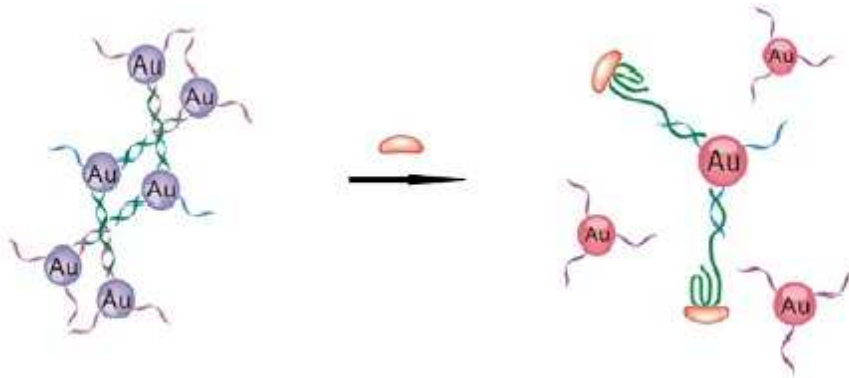


Abbildung 10: Aptamere als Biosensoren. Aptamere wurden gekoppelt mit Nanopartikeln, die nach der Bindung des Liganden dissoziieren und zu einem Farbwechsel führen [Song *et al.*, 2008].

Im Bereich der Lebensmittelsicherheit und der Umweltkontrolle können Aptamere eingesetzt werden, um Kontaminationen in der Nahrung, im Trinkwasser oder auch in der Luft nachzuweisen. Enthaltene Bakterien, Sporen, Viruspartikel und Toxine können krankheitserregend sein [Fan *et al.*, 2008; Tombelli *et al.*, 2007]. Pan *et al.* [2006] generierten ein Aptamer gegen ein Protein von *Salmonella enterica* serovar Typhi, dem Erreger von Typhus. Für das pathogene Bakterium ist das Protein wichtig für das Eindringen in menschliche Zellen. Durch die Bindung des Aptamers wird das Protein inhibiert und das Bakterium kann nicht in die Zelle gelangen.

1.3. SELEX: Die Vor- und Nachteile

Der Einsatz von Aptameren ist vielseitig und sie besitzen viele Eigenschaften, die vorteilhaft sind. Für fast jedes Molekül, Protein oder auch Zellen und Gewebe ist es möglich, ein Aptamer herzustellen. Sie besitzen ein breites Spektrum der Anwendung, von der Molekularbiologie bis hin zur Medizin. DNA-Aptamere sind im Gegensatz zu Enzymen oder Protein-basierenden Biosensoren chemisch sehr stabil und ändern oft ihre Konformation bei der Bindung des Moleküls. Daher zeigen sie eine hohe Flexibilität in der Herstellung neuer Biosensoren und besitzen eine hohe Sensibilität und Selektivität bei der Detektion. Werden Aptamere als Medikament eingesetzt, kann die Aktivität selektiv kontrolliert werden, da Gegenmittel leicht herstellbar sind.

Die hohe Diversität des Startpools macht es möglich, hochaffine und sehr spezifische Aptamere zu generieren [Rhodes *et al.*, 2000]. Die Nukleinsäurefragmente sind in der Lage zwischen chiralen Molekülen und verschiedenen Epitopen eines Moleküls zu differenzieren. Des Weiteren ist kein detailliertes Wissen über das Target nötig [Song *et al.*, 2008; Stoltenburg *et al.*, 2007].

Aptamere zeigen als Nukleinsäuren eine hohe Haltbarkeit, sie können als Puder oder in Lösung aufbewahrt werden. Denaturierte Aptamere können innerhalb von Minuten wieder regeneriert werden [Fang *et al.*, 2010; Stoltenburg *et al.*, 2007]. Durch chemische Modifikationen können die Bindung und Stabilität verbessert, sowie neue Eigenschaften eingeführt werden. Dies wird genutzt um die Degradierung der Aptamere durch Enzyme zu verhindern und funktionelle Gruppen anzufügen [Glökler *et al.*, 2010; Stoltenburg *et al.*, 2007]. Die Parameter der einzelnen Selektionschritte können während der SELEX den Anforderungen angepasst werden. Sind die Aptamere selektiert und charakterisiert, können sie leicht auch in großen Mengen von vielen Firmen synthetisiert werden. Die Herstellung ist kosteneffektiv und sowohl von hoher Qualität als auch von hoher Quantität [Fan *et al.*, 2008; Glökler *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2008].

Aptamere besitzen vor allem gegenüber Antikörpern viele Vorteile. Zur Aptamersynthese werden keine Tiere oder Zellkulturen benötigt und sie stellen keine besonderen Aufbewahrungsanforderungen wie Antikörper [Fan *et al.*, 2008]. Im Gegensatz zu Antikörpern zeigen sie keine Immunantwort und können aufgrund ihrer geringen Größe leicht in Zellen und Gewebe eindringen [Fang *et al.*, 2010; Glökler *et al.*, 2010]. Antikörper können ihr Target nur unter physiologischen Bedingungen nachweisen. Aptamere sind dagegen *in-vitro* und *in-vivo* verwendbar. Aptamere weisen eine schnellere Abbaurrate als Antikörper auf. Dies kann von Vorteil sein bei potentiell cytotoxischen Stoffen, zum Beispiel bei Chemotherapeutika. Hinzu kommt, dass durch chemische Modifikationen das Aptamer länger im Blutkreislauf verbleiben kann [Stoltenburg *et al.*, 2007].

Allerdings weist das SELEX-Verfahren auch einige Nachteile auf. Unter anderem ist es nicht möglich vorherzusagen, ob eine SELEX erfolgreich sein wird. Ein ausführliches Wissen über das Zielmolekül ist keine Voraussetzung zur Selektion eines Aptamers, jedoch kann die Eignung eines Moleküls für SELEX auch nicht zuvor beurteilt werden [Mayer, 2009]. Erschwert wird die Selektion bei negativ geladenen und hydrophobischen Molekülen, da die Nukleinsäurefragmente selbst negative Phosphatgruppen tragen [Glökler *et al.*, 2010; Stoltenburg *et al.*, 2007]. Strukturanalysen zeigen, dass Aptamere kleine Liganden umgeben (Abbildung 11), dies lässt wenige Möglichkeiten für Interaktionen mit anderen Molekülen zu [Song *et al.*, 2008].

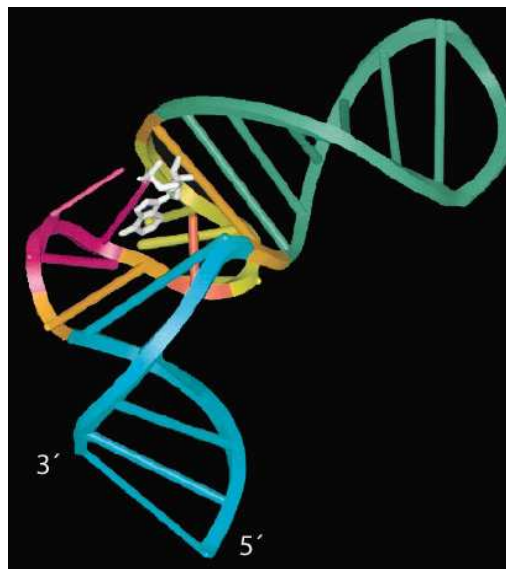


Abbildung 11: Struktur des AMP-RNA-Komplex. Das gebundene AMP (Adenosinmonophosphat) ist in weiß dargestellt [Patel *et al.*, 1997].

Es besteht die Möglichkeit, dass Aptamere mitselektiert werden, die an die Oberfläche der Reaktionsgefäße binden oder auch an Bestandteile der Puffer. Durch Negativ-Selektionen können die unspezifischen Binder verringert werden [Rhodes *et al.*, 2000; Stoltenburg *et al.*, 2007]. Ein weiterer Nachteil ist die relativ geringe Stabilität von RNA-Aptameren. Chemische Modifikationen können aber die Stabilität verbessern und vor dem Abbau durch Nukleasen schützen. Weiterhin können bei jedem enzymatischen Schritt aufgrund der Aktivität des Enzyms ungewollte Mutationen auftreten oder bestimmte Fragmente bevorzugt amplifiziert werden. Dies gilt vor allem für die *in-vitro* Selektion von RNA-Aptameren, da hier mehrere enzymatische Schritte während einer Selektionsrunde nötig sind. Die Effizienz der Transkription und der Amplifikation kann die Quantität jedes einzelnen Oligonukleotids in der Nukleinsäurebank beeinflussen [Rhodes *et al.*, 2000]. Für SELEX ist kein allgemein geltendes Standardprotokoll vorhanden. Die Parameter müssen den Umständen neu angepasst werden. Allerdings zeichnet sich SELEX so durch eine hohe Flexibilität aus [Stoltenburg *et al.*, 2007].

1.4. Die Q-Beta Replikase

In dieser Arbeit wurden die selektierten RNA-Aptamere mit der Q-Beta Replikase amplifiziert. Die Q-Beta RNA-Replikase ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die aus dem Bakteriophagen Q-Beta stammt. Die Replikase synthetisiert einzelsträngige RNA in 5'-3' Richtung und benötigt dafür weder einen Promoter noch Primer. Solange die Replikase im Überschuss vorhanden ist, verläuft die Amplifikation exponentiell, da sowohl der Plus-Strang als auch der neu synthetisierte Minus-Strang als Template dienen [Biebricher *et al.*, 1981; Blumenthal *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1996]. Die Q-Beta Replikase amplifiziert *in-vitro* RNA effizienter als eine PCR. Außerdem ist die Reaktion isothermal und benötigt keinen Denaturierungsschritt [Ugarov *et al.*, 2003].

Infiziert der Q-Beta Phage das *Escherichia coli*-Bakterium werden von dessen Genom in einer Stunde bis zu 10^4 Kopien synthetisiert. Kleinere sogenannte RQ RNAs werden noch schneller produziert, ca. 10^{10} Kopien können in zehn Minuten amplifiziert werden [Ugarov *et al.*, 2008; Ugarov *et al.*, 2003].

1.4.1. Der Aufbau der Q-Beta Replikase

Das Enzym ist ein Heterotetramer bestehend aus vier Untereinheiten (Abbildung 12). Die katalytische β -Untereinheit stammt vom Bakteriophagen, die Translationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts und die ribosomale Untereinheit S1 werden von der Wirtszelle rekrutiert [Blumenthal, 1979].

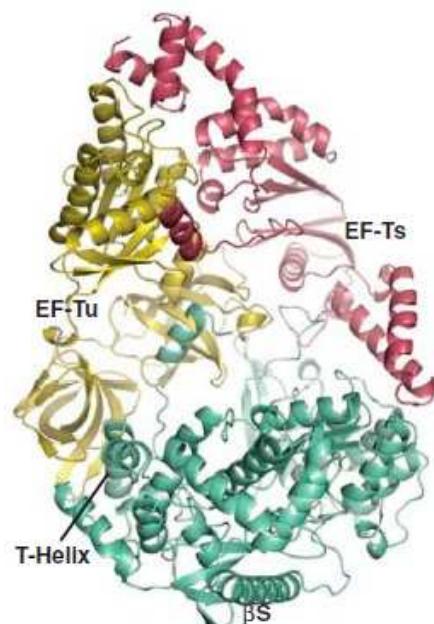


Abbildung 12: Drei-dimensionale Struktur des Kernkomplexes der Q-Beta Replikase. Bestehend aus der β -Untereinheit (grün) und den Wirtsfaktoren EF-Tu (gelb) und EF-Ts (rot) [Kidmose *et al.*, 2010].

Der weitere Wirtsfaktor Hfq ist für eine effiziente Replikation nötig. Er wird gebraucht, um die Replikase zu rekrutieren und bindet spezifische Regionen der Template-RNA [Urabe *et al.*, 2010]. Hfq ist ein Chaperon und vermittelt wahrscheinlich den Zugang der β -Untereinheit zum 3'Ende des Matrizenstrangs. Die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts sind für die Replikationsinitiation erforderlich. EF-Tu ist wichtig für die Erkennung und Bindung der Template-RNA. EF-Ts hat möglicherweise eine stabilisierende Wirkung. Zum Erkennen des Plus-Strangs der genomischen Q-Beta RNA ist das ribosomale Protein S1 wichtig [Brown *et al.*, 1996; Schuppli *et al.*, 1997]. Die β -Untereinheit des Holoenzym besteht aus drei Domänen, die in Abbildung 13 abgebildet sind. Die Finger-Domäne ist mit der Daumen-Domäne über die Brückenregion verbunden [Kidmose *et al.*, 2010].

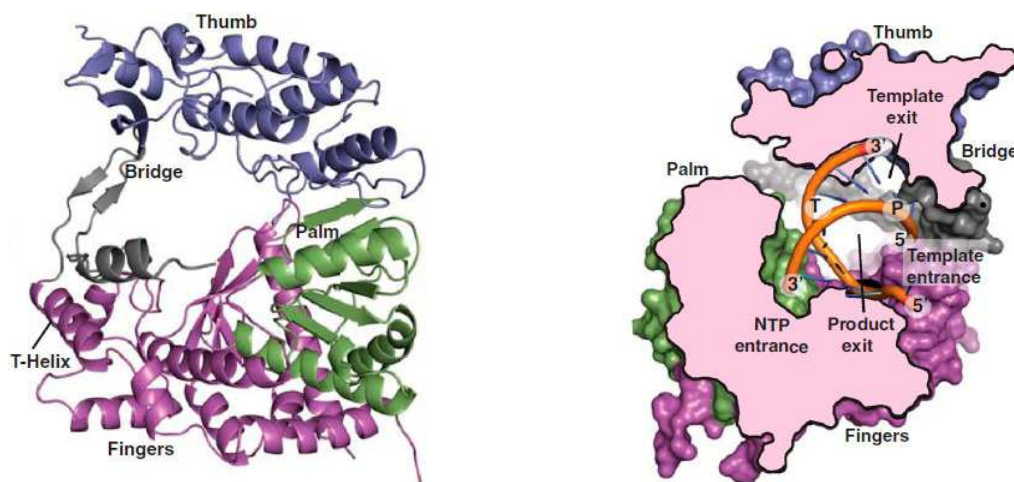


Abbildung 13: Drei-dimensionale Struktur der Q-Beta-Replikase. Links dargestellt ist die β -Untereinheit, bestehend aus der Daumen-Domäne (blau), der Handflächen-Domäne (grün), Finger-Domäne (magenta) und der Brückenregion (grau). Der Querschnitt durch die Q β -Untereinheit (rechts) zeigt die möglichen Kanäle für die Template-RNA (T), die synthetisierte RNA (P) und die NTPs [Kidmose *et al.*, 2010].

Die Q-Beta Replikase repliziert exponentiell, da der Plus- und der Minus-Strang als Matrize dienen. Doppelsträngige RNA kann nicht amplifiziert werden, daher verhindert die Q-Beta Replikase, dass sich der Matrizen-Strang und der neu synthetisierte Strang aneinander lagern [Weissmann *et al.*, 1968]. Möglicherweise trägt die Brücken-Region dazu bei, die entstehende Duplex-Struktur zwischen dem Matrizen- und dem Produktstrang zu entwinden. Auch die separierten Kanäle für die RNA-Stränge und die ausgeprägte Sekundärstruktur der RNA-Fragmente scheinen die Bildung von doppelsträngiger RNA zu verhindern [Kidmose *et al.*, 2010].

1.4.2. Die ungewöhnliche Template-Spezifität

Die Q-Beta Replikase zeigt eine ungewöhnliche Template-Spezifität. Die hohe Selektivität zeigt sich zum Beispiel darin, dass die RNA von dem verwandten Phagen MS2 nicht repliziert wird [Haruna *et al.*, 1965]. Hingegen gibt es unspezifische RNA, die spontan auch ohne die Zugabe von Template-RNA amplifiziert wird. Diese RNA-Fragmente wurden als „6S“, „variant“ und RQ RNA bezeichnet und sind zwischen 100 und 300 Nukleotide lang [Banerjee, 1969; Munishkin *et al.*, 1991; Schaffner *et al.*, 1977; Urabe *et al.*, 2010]. Der genaue Ablauf der Template-Erkennung ist noch nicht vollständig geklärt [Kidmose, 2010]. Es konnten zwei Strukturelemente identifiziert werden, die die Replikation initiieren. Am 3' Terminus der RNA befindet sich eine Oligo(C)-Gruppe bestehend aus drei Cytidinen, am 5' Ende die komplementäre Oligo(G)-Gruppe. Das GTP (Guanosintriphosphat) dient als initiiertes Nukleotid [Ugarov *et al.*, 2008]. Ugarov *et al.* [2003] konnten RNA-Fragmente identifizieren, deren 3' Ende aus unterschiedlichen Sequenzen bestand. Somit scheint die Q-Beta Replikase zum einen eine hohe Spezifität gegenüber der Template-RNA zu besitzen, zum anderen kann die Replikase aber auch eine Vielzahl an unterschiedlichen RNA-Sequenzen replizieren. Nach Ugarov *et al.* [2003] wird die replizierbare RNA in zwei Klassen eingeteilt: in legitime und illegitime. Legitime RNA-Fragmente benötigen GTP zur Replikationsinitiation. ATA (Aurintricarbonsäure) ist ein Inhibitor von Protein-RNA-Interaktionen und da auch bei der Zugabe von ATA die RNA weiter amplifiziert, lässt dies auf einen stabilen Replikationskomplex schließen. Dagegen bedürfen illegitime Template-RNAs kein GTP und die Amplifikation wird durch das Hinzufügen von ATA gestoppt [Ugarov *et al.*, 2003]. Möglicherweise bindet das Enzym zuerst unspezifisch an das 3' Ende der RNA und beginnt diese zu kopieren. Bei dem Vorhandensein von GTP erfolgt dann die Bildung eines geschlossenen RNA-Enzym-Komplexes. Illegitime RNA-Fragmente bilden diesen Komplex nicht. Es kann leichter zu einem Abbruch der Replikation kommen und die Vervielfältigung ist daher nicht exponentiell. Die Enden legitimer RNA-Templates binden aneinander und bilden ein zirkuläres RNA-Molekül [Ugarov *et al.*, 2008].

Ugarov *et al.* [2008] stellten ein Hybridmolekül einer bekannten hocheffizient replizierbaren RQ RNA her. Die RQ135 RNA wurde in zwei Fragmente geteilt. Das 3' Ende, welches die Merkmale einer legitimen RNA besaß, zeigte eine um den Faktor 90 langsamere Syntheserate als die vollständige RNA. Nachdem das illegitime 5' RNA-Fragment mit dem 3' RNA-Fragment hybridisiert wurde, stieg die Amplifikationsrate nahezu auf die Höhe der intakten RQ135 RNA an. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Struktur der RNA-Moleküle ein wichtiger Aspekt für eine effiziente exponentielle Amplifikation ist [Ugarov *et al.*, 2008].

In dieser Arbeit wurden RNA-Amplifikationen einer Nukleinsäurebank mit Hilfe der Q-Beta Replikase durchgeführt. Um eine hohe Syntheserate sicher zu stellen, wurden die flankierenden Primersequenzen dem Hybridmolekül nachempfunden (Abbildung 14).

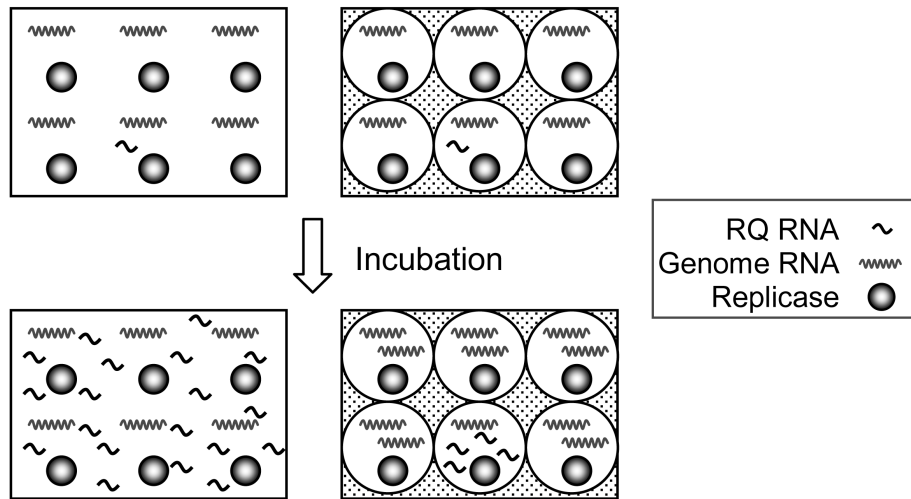


Abbildung 15: Q-Beta Replikation in Emulsion. Vergleich von Amplifikation ohne Emulsionsmix (links) und Amplifikation in Emulsion (rechts) [Urabe *et al.*, 2010].

Unter der Verwendung von Wasser-in-Öl-Emulsion kann die Effizienz der Synthese von gewünschten RNA-Sequenzen gesteigert werden. Da die Replikation in abgeschlossenen Reaktionseinheiten stattfindet, beeinflussen sich die parallel laufenden Amplifikationen nicht [Urabe *et al.*, 2010].

1.5. Die Zielmoleküle

Für vier Moleküle sollten in dieser Arbeit DNA- und RNA-Aptamere selektiert werden. Die kleinen Zielmoleküle besitzen ein Molekulargewicht zwischen $111,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Histamin) und $441,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Folsäure).

1.5.1. Die Phytohormone Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure

Indol-3-essigsäure und Gibberellinsäure sind Phytohormone und regulieren eine Vielzahl an Prozessen.

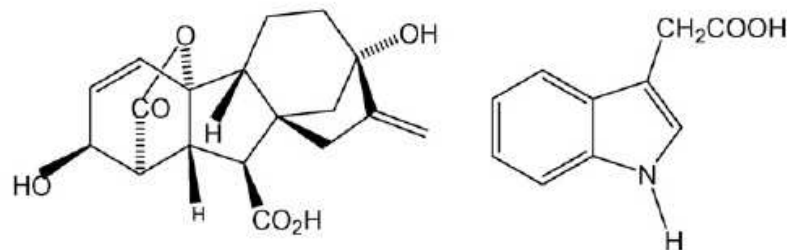


Abbildung 16: Chemische Struktur von Gibberellinsäure (links) und Indol-3-essigsäure (rechts) [Hou *et al.*, 2008].

Die Gibberellinsäure gehört zu der Gruppe der Gibberelline, die über 120 verschiedene chemische Verbindungen umfasst. Gibberelline sind aus einem tetracyclischen Ringsystem aufgebaut und sind Diterpene.

Die Biosynthese erfolgt in drei Schritten in den Plastiden, dem Cytoplasma und dem Endoplasmatischen Retikulum. In höheren Pflanzen kommt Gibberellinsäure (GA_3) nur vereinzelt vor. Allerdings können die meisten von Gibberellinen gesteuerten Prozesse durch Gibberellinsäure ausgelöst werden und GA_3 findet daher Anwendung für Experimente. Gibberelline tragen zur Internodienstreckung bei, indem sie das Zellwachstum und die Zellteilung fördern. Sie heben die Dormanz der Samen auf und mobilisieren Speicherstoffe. Weiterhin sind sie in der Lage, die Genexpression der α -Amylase im Aleurongewebe von Keimlingen zu aktivieren. Bei einigen Prozessen wirken sie den Auxinen entgegengesetzt. Zum Beispiel fördert Gibberellin die Bildung von männlichen Blüten, Auxin hingegen die weiblicher Blüten.

Gibberellinsäure kann in hohen Mengen aus dem Kulturfiltrat des Pilzes *Gibberella fujikuroi* isoliert werden und wird in der Landwirtschaft unter anderem zur Förderung des Wachstums von Obst eingesetzt [Schopfer *et al.*, 2006; Sitte *et al.*, 2002].

Indol-3-essigsäure (IAA) wird zu den Auxinen gezählt und ist in Pflanzen weit verbreitet. Das pflanzliche Hormon ist essentiell und reguliert Entwicklungsprozesse.

Die Biosynthese erfolgt in Geweben mit hoher Teilungsaktivität wie zum Beispiel in embryonalen Geweben und jungen Blättern. Über mehrere Stoffwechselwege kann IAA aus

L-Tryptophan gebildet werden. Auch die Tryptophan unabhängige Synthese ist möglich. Dies stellt sicher, dass kein Auxinmangel auftritt. Der Abbau erfolgt durch den oxidativen Katabolismus.

Das Auxin fördert die Zellstreckung und somit das Längenwachstum. Des Weiteren fördert es die Bildung von Seiten- und Adventivwurzeln, die Fruchtentwicklung und viele weitere Prozesse. Indol-3-essigsäure hat auch Auswirkungen auf Photo- und Gravitropismus, indem es durch gerichteten Transport die Zellstreckung bestimmter Gewebeabschnitte fördert. Damit die Pflanze in Richtung des Lichts wächst, wird IAA in die Zellen transportiert die im Schatten liegen. Durch das einseitige Wachsen kann sich die Pflanze zum Lichteinfall neigen.

Die endogene Konzentration von Indol-3-essigsäure ist in den einzelnen Geweben sehr unterschiedlich. Große Mengen kommen in apikalen Sproßmeristemen und wachsenden Blättern vor. IAA liegt überwiegend in konjugierter Form vor. Zum Beispiel kann es mit Glucose verestert sein und in Vakuolen gespeichert werden. Biologisch aktiv sind aber nur ungebundene Moleküle. So wird die endogene Konzentration im Gewebe gesteuert.

Auxine werden in der Landwirtschaft als Herbizid gegen dicotyle Unkräuter eingesetzt. Monocotyle Kulturpflanzen können es schnell durch Konjugation inaktivieren und werden so in ihrem Wachstum nicht beeinflusst [Schopfer *et al.*, 2006; Sitte *et al.*, 2002; Taiz *et al.*, 2000].

Aptamere für Phytohormone könnten als *Riboswitch* eingesetzt werden. Da die Gene weitgehend bekannt sind könnte wie schon zuvor beschrieben die Genexpression reguliert werden (Abbildung 8 und 9). Aber auch für weitere molekularbiologische Untersuchungen zum Beispiel als Biosensoren und zur Affinitätschromatographie könnten Aptamere hilfreich sein.

1.5.2. Histamin

Histamin gehört zu den Hormonen des Menschen und wird hauptsächlich aus ECL-Zellen (enterochromaffin-like cells) der Magendrüsen und aus Mastzellen freigesetzt. Die chemische Struktur des Monamin ist in Abbildung 17 dargestellt.

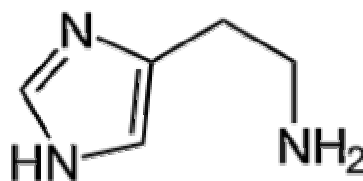


Abbildung 17: Chemische Struktur von Histamin [Sigma Aldrich, Produkt Information].

Histamin entsteht durch die Carboxylierung von Histidin und bindet an spezielle Histamin-Rezeptoren. Es wirkt als Transmitterstoff im Gehirn und erhöht die Produktion von Magensäure. Außerdem beeinflusst es unter anderem die Nahrungsaufnahme, das Sexualverhalten und fördert den Wachzustand. Histamin vermittelt Entzündungsreaktionen, es erweitert die Gefäße und senkt dadurch den Blutdruck. Leukozyten können so am Endothel haften bleiben und in das betroffene Gewebe eindringen. Da es an immunologischen Reaktionen beteiligt ist, kann Histamin zu Hautrötungen, Nesselsucht, Schleimhautanschwellung und zu einer Verengung der Atemwege führen.

Allergische Reaktionen gegen Histamin treten bei etwa einem Prozent der Gesamtbevölkerung auf, davon sind 80 Prozent Frauen mittleren Alters. Die Histaminintoleranz zeigt sich in Symptomen wie zum Beispiel Juckreiz, Fließschnupfen, Durchfall und Kopfschmerzen. Ausgelöst wird die Allergie durch ein Ungleichgewicht zwischen dem vorhandenen und dem abgebauten Histamin. Das Amin wird über zwei Stoffwechselwege abgebaut. Dabei wird extrazelluläres Histamin durch die Diaminoxidase (DAO) deaminiert. Eine Störung des Enzyms kann zur Unverträglichkeit führen. Durch die Aufnahme von histaminreicher, Histamin freisetzender oder die DAO hemmender Nahrung können die genannten allergischen Reaktionen auftreten. Der Histamingehalt in Nahrungsmitteln steigt mit zunehmenden Reife- und Gärungsgrad. Rotwein zum Beispiel besitzt hohe Mengen an Histamin und ist gleichzeitig ein Inhibitor der DAO. Wird eine Intoleranz gegenüber Histamin festgestellt empfiehlt sich eine Histaminarme Ernährung oder die Einnahme von Antihistaminika. Da Histamin den Wachzustand beeinflusst kann es zur Ermüdung nach dem Einnehmen von Antihistaminika kommen [Klinke *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2009; Maintz *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2007].

Histamin wird von einigen Pflanzen zum Schutz gegen Fraßfeinde eingesetzt. Die Brennhaare der Brennnesseln bestehen unter anderem aus Histamin. Dieses ist für die juckenden und schmerzhaften Ausschläge bei dem Kontakt mit der Pflanze verantwortlich (Sitte *et al.*, 2002).

Ein Histamin-Aptamer könnte als Nachweismethode von Histaminhaltigen Lebensmitteln dienen, zum Beispiel durch einen Teststreifen, auf dem das Aptamer immobilisiert ist. Das zeigt das bereits beschriebene Beispiel von Liu *et al.* [2006], in dem Kokain in Serumproben nachgewiesen werden konnte. Das Aptamer könnte auch die Bindung an die Histamin-Rezeptoren inhibieren.

1.5.3. Folsäure

Folsäure ist ein wasserlösliches Vitamin und kommt vor allem in grünem Blattgemüse vor. Es wird in die Gruppe der B-Vitamine eingeordnet und gehört chemisch zu den Pteroylmonoglutamten (Abbildung 18).

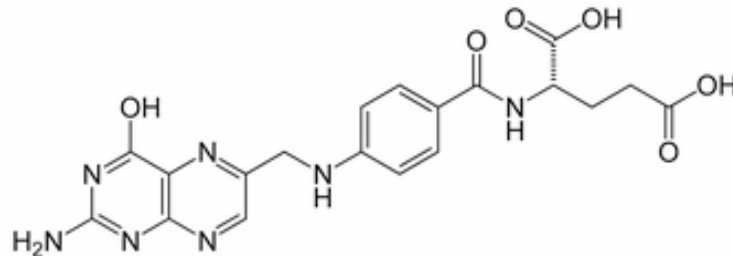


Abbildung 18: Chemische Struktur von Folsäure [Sigma-Aldrich, Produkt Information].

In der Nahrung kommt es als natürliches Folat-Polyglutamt vor. Vor der Absorption wird das Molekül durch Peptidasen im Dünndarm hydrolysiert und dann aufgenommen. Folsäure spielt eine wichtige Rolle als Coenzym bei der Übertragung von C1-Gruppen auf Purine und Pyrimidine, sowie der Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Die DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung) empfiehlt 0,4 mg pro Tag zu sich zu nehmen. Etwa zehn Prozent der Gesamtbevölkerung und bis zu 50 Prozent in armen Regionen zeigen Folsäureunterversorgung. Werden zu geringe Mengen von dem Vitamin aufgenommen, treten Mangelerscheinungen auf. Diese können von Appetit- und Gewichtsverlust, über Kopfschmerzen bis hin zur Anämie reichen. Schwerer Folsäuremangel kann zu Herzerkrankungen, Krebs, sowie Funktionsstörungen des Gehirns führen. Besonders wichtig ist die Folsäure für Schwangere, da eine Unterversorgung zu Neuralrohrdefekten des Kindes führen kann. In Europa wird jedes Jahr bei über 4000 ungeborenen Kindern diese Fehlbildung diagnostiziert. Schwangeren wird daher empfohlen, präventiv vier Wochen vor der Empfängnis eine erhöhte Dosis von 0,6 mg pro Tag zu sich zu nehmen. In Studien konnte gezeigt werden, dass auch Herzfehler und Gaumenspalten bei der zusätzlichen Einnahme von Folsäure weniger häufig auftreten. In den USA werden bereits Lebensmittel wie zum Beispiel Mehl mit Folsäure angereichert und auch in Deutschland ist Salz das mit Folsäure versetzt ist, zu erhalten. Bei einer Überdosierung kommt es allerdings zu Symptomen wie Schlaflosigkeit und Nervosität [Behrends *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2009; Zwiauer, 2005].

Ein Aptamer, das Folsäure bindet, könnte während der synthetischen Herstellung zum Beispiel zur Aufreinigung eingesetzt werden. Aber auch in der Diagnostik eines Folsäuremangels ist ein quantitativer Nachweis mit Hilfe von Aptameren vorstellbar. Des Weiteren könnten die Funktionen der Folsäure *in-vivo* genauer untersucht werden.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es Aptamere gegen verschiedene kleine Moleküle zu selektieren und das Verfahren zu optimieren. Die Zielmoleküle waren Gibberellinsäure, Indol-3-essigsäure, Histamin und Folsäure. Mit dem SELEX-Verfahren sollten RNA- und DNA-Aptamere generiert werden.

Es sollte untersucht werden, ob eine Anreicherung von Aptameren bereits nach drei Selektionsrunden möglich ist. Dazu sollten die Nukleinsäurefragmente mittels der SOLEXA-Technologie sequenziert werden.

Zur Optimierung der RNA-SELEX sollten die angereicherten Nukleinsäurefragmente mit der RNA-abhängigen Q-Beta RNA-Polymerase repliziert werden. Um die Effizienz der Replikation zu verbessern, sollten verschiedene Parameter untersucht werden.

Zur besseren Reproduzierbarkeit und zur parallelen Selektion von Aptameren, sollten die DNA-Aptamere in automatisierten Selektionsrunden angereichert werden.

Der Erfolg der SELEX sollte durch eine Diversitätsanalyse überprüft werden.

Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die Q-Beta Replikase bestimmte Sequenzen einer Nukleinsäurebank bevorzugt amplifiziert. Hierzu sollten drei aufeinander folgende Replikationen einer Nukleinsäurebank durchgeführt werden und durch eine Diversitätsanalyse untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Alle in der Arbeit verwendeten Geräte sind im Folgenden mit dem Hersteller aufgeführt.

DynaMag	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophoresis EPS 601	Pharmacia biotech, Amersham
KingFisher Flex	Thermo Scientific, Vantaa
Laborwaage LC 2200	Saturius, Göttingen
Light Cycler 480 II	Roche, Mannheim
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym, Oldendorf
pH-Meter 762 calimatic	Knick, Berlin
Rotator stuart SB 3	BioCote, Staffordshire
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Savant SpeedVac Plus SC210A	Thermo Scientific, Vantaa
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
UVT-28 M	Herolab, Wiesloch
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Chemikalien und sonstige Lösungen

Nachstehend sind die verwendeten Chemikalien und Lösungen mit deren Bezugsquelle aufgelistet. Eigenschaften und Sicherheitsdatenblätter sind vom Hersteller zu beziehen.

Abil WE 09	Evonik Goldschmidt, Essen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Brij-700	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
DTT	Roboklon, Berlin
EDC	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim

EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Folsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gibberellinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Indol-3-essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NTPs	Bioline, Luckenwalde
MES Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mangan(II)-Chlorid	Biolabs, New England
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
O´Range Ruler 20bp Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
SiMAG-Amine Beads	Chemicell, Berlin
SiMAG-Carboxyl Beads	Chemicell, Berlin
SYBRGreen I	Invitrogen, Karlsruhe
Tegosoft DEC	Evonik Goldschmidt, Essen
Tris-Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tween 20	Riedel-de Haen, Seelze

2.1.3. Enzyme und molekularbiologische Kits

Die gebrauchten Enzyme und Kits sind im Weiteren erfasst. Die Enzyme sind mit ihrer Konzentration angegeben, wobei im Allgemeinen eine Unit (U) die Menge an Enzym ist, um unter optimalen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umzusetzen. Die spezifischen Angaben der Enzymaktivität sind den Informationsblättern der Hersteller zu entnehmen.

DNase [1 U/μl]	Promega, Mannheim
EURx „PCR Clean Up DNA – Purification Kit“	Roboklon, Berlin
Klenow Fragment Exo ⁻ [10 U/μl]	Roboklon, Berlin
Q-Beta Replicase [1 U/μl]	Epicentre, Oldendorf
sbeadex DNA Isolation Kit	Agowa genomic, Berlin
Taq DNA Polymerase [5 U/μl]	Roboklon, Berlin
T7 Enzym Mix	Promega, Mannheim

2.1.4. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 mit ihrem Namen, ihrer Sequenz in 5'-3'-Richtung, ihrer Länge und dem Hersteller aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Nukleinsäurebanken

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (nt)	Hersteller
Bank 40	5'-TGA CAC CGT ACC TGC TCT 40N AAG CAC GCC AGG GAC TAT-3'	76	Purimex, Grebenstein
G340C3	5'-GGG 40N CCC-3'	46	Purimex, Grebenstein
QST40	5'-ATA GGG GTT CCA ACC GGA AG 40N CCG GTT TCG GAC CTC CAG-3'	78	Purimex, Grebenstein
QBank40	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTC CAA CCG GAA GTT GAC ACC GTA CCT GCT CT 40N AAG CAC GCC AGG GAC TAT CCG GTT TCG GAC CTC CAG TGC GTG TTA CCG CAC TGT TAG CCC-3'	153	Purimex, Grebenstein
qb3.888	5'-CAC CGT ACC TGC TCT ATC TAA TAG GGC ATC CGT ACG TTG TTC TTG ACG ATG CTT CAA GCA CGC CAG GGA C-3'	70	Sigma-Aldrich, Steinheim
T7G340C3	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG 40N CCC-3'	64	Purimex, Grebenstein

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (nt)	Hersteller
Gi1Q3	5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA ATC ACG CTG GAG GTC CGA AAC CGG-3'	45	Purimex, Grebenstein
GiAQ5	5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAT CAC GGG GTT CCA ACC GGA AG -3'	80	Purimex, Grebenstein
GiBQ5	5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TCG ATG TGG GTT CCA ACC GGA AG-3'	80	Purimex, Grebenstein
GiCQ5	5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTT AGG CGG GTT CCA ACC GGA AG-3'	80	Purimex, Grebenstein
GiDQ5	5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTG ACC AGG GTT CCA ACC GGA AG-3'	80	Purimex, Grebenstein
Pro3	5'-ATA GTC CCT GGC GTG CTT-3'	18	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pro5	5'-TGA CAC CGT ACC TGC TCT-3'	18	Sigma-Aldrich, Steinheim
T7P	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3'	19	Purimex, Grebenstein
T7Pro5	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA CAC CGT ACC TGC TCT-3'	36	Sigma-Aldrich, Steinheim
T7QF	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TTC CAA CCG GAA G-3'	34	Sigma-Aldrich, Steinheim
QF5	5'-GGG GTT CCA ACC GGA AG-3'	17	Sigma-Aldrich, Steinheim
QR	5'-GGG CTA ACA GTG CGG TAA CAC GCA CTG GAG GTC CGA AAC CGG-3'	42	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese Standard

Als Größenstandard bei Agarosegelen wurde der O'Range Ruler 20bp Ladder von Fermentas eingesetzt. In der Abbildung 19 sind die Banden mit ihren jeweiligen Größen dargestellt. Mit diesem DNA-Marker ist es möglich, die Größen der Nukleinsäuren in den aufgetrennten Proben zu bestimmen. Quantitative Aussagen können nicht getroffen werden.

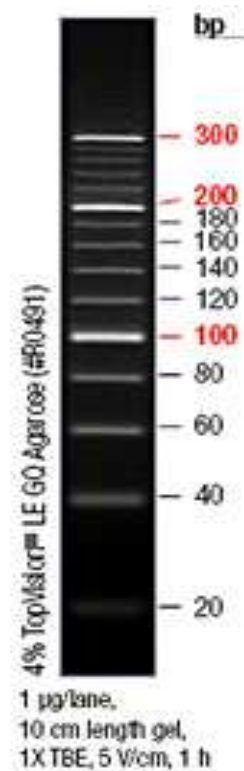


Abbildung 19: Basenpaarlänge der Banden des O'Range Ruler 20bp Ladder [Fermentas, Produkt Information].

2.1.6. Puffer

Alle selbst hergestellten Puffer sind mit ihren Reagenzien und den jeweiligen Konzentrationen aufgeführt.

1x TBE

89 mM Tris10

89 mM Borsäure

2 mM Na₂EDTA (pH 8.0)

MES-Puffer

0,1 M MES, pH 5.0 / pH 6.0

0,04 mg/µl EDC

Selektionspuffer pH 7.4

200 mM Tris
50 mM MgCl₂
20 mM CaCl₂
20 mM KCl
1400 mM NaCl
0,5% Tween 20

10x Diversitätsassay (DA)-Puffer

200 mM MOPS
100 mM EDTA
2,5 M NaCl
0,3% Brij-700

10x Agarose-Gelelektrophorese-Ladepuffer

0,1% Xylencyanol
0,1% Bromphenolblau
0,5% SDS
0,1 M EDTA
50% Glycerol

2.2. Methoden

2.2.1. DNA und RNA Amplifikation in Emulsion

Nahezu alle DNA- und RNA-Amplifikationen wurden in Emulsion durchgeführt. Der Standardansatz bestand aus 73% Tegosoft, 20% Mineralöl und 7% Abil WE 09. Das Verhältnis von Reaktionsansatz zu Emulsions-Mix betrug eins zu sechs. Zuerst wurden 219 µl Tegosoft, dann 60 µl Mineralöl und zuletzt 21 µl Abil WE 09 zusammen pipettiert. Der Mix wurde kurz gemischt und für einige Minuten auf Eis gestellt. Zu 50 µl vom jeweiligen Reaktionsansatz wurden 300 µl Emulsions-Mix gegeben und 5 min bei 4°C geschüttelt. Durch das Schütteln entstehen die in der Einleitung bereits beschriebenen Mizellen, wodurch die Amplifikationen der einzelnen Nukleinsäurefragmente in einem geschlossenen Reaktionsvolumen erfolgen. Nach den Amplifikationen wurde 1 ml Isobutanol in die Proben gegeben, um die Emulsion aufzubrechen.

Im Folgenden werden Reaktionen mit Emulsions-Mix als „geschlossen“ und Reaktionen, die nicht in Emulsion durchgeführt werden als „offen“ bezeichnet.

Zur optimalen Amplifikation der Nukleinsäurefragmente im Emulsions-Mix wurde die Komplexität der Nukleinsäurebanken berechnet.

Berechnung der Mizellenanzahl im Emulsions-Mix

Es werden 300 µl Emulsion-Mix mit 50 µl Reaktionsansatz vermischt. Somit beträgt der Reaktionsraum 50 µl. Nach Diehl *et al.* [2006] beträgt die Mizellengröße im Durchmesser 3 – 9 µm.

Das Kugelvolumen wird mit folgender Formel berechnet:

$$V = 1/6 \cdot \pi \cdot d^3$$

$$d = 3 \mu\text{m} \rightarrow V = 14,14 \mu\text{m}^3$$

$$d = 9 \mu\text{m} \rightarrow V = 381,7 \mu\text{m}^3$$

$$1 \mu\text{l} = 1 \text{mm}^3 = 10^9 \mu\text{m}^3$$

$$\rightarrow 50 \mu\text{l wässrige Phase entsprechen } 5 \cdot 10^{10} \mu\text{m}^3$$

$$5 \cdot 10^{10} \mu\text{m}^3 : 14,14 \mu\text{m}^3 = 3,4 \cdot 10^9 \text{ Mizellen}$$

$$5 \cdot 10^{10} \mu\text{m}^3 : 381,7 \mu\text{m}^3 = 1,26 \cdot 10^8 \text{ Mizellen}$$

In den Reaktionsansätzen befinden sich 10^8 bis 10^9 Mizellen. Damit sich je ein Molekül der jeweiligen Nukleinsäurebank in je einer Mizelle befindet, wurde dementsprechend die Molekülanzahl ausgerechnet.

Berechnung der Molekülanzahl der DNA- bzw. RNA-Nukleinsäurebanken

1 mol = $6 \cdot 10^{23}$ Moleküle

Molekulargewicht (im Durchschnitt): RNA 339,5 g/mol pro Base

DNA 327 g/mol pro Base

Beispielrechnung:

QST40-RNA besteht aus 99 Basen

$99 \cdot 339,5 \text{ g/mol} \approx 34 \text{ kg/mol}$

$34 \text{ kg} = 1 \text{ mol} = 6 \cdot 10^{23}$

$34 \text{ ng} = 6 \cdot 10^{11} \rightarrow 0,1 \text{ ng} \approx 1,7 \cdot 10^9 \text{ Moleküle}$

2.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1983 von Kary Mullis das erste Mal beschrieben und zählt heute zu den wichtigsten molekularbiologischen Methoden. Mittels PCR können Nukleinsäurefragmente amplifiziert werden, wobei DNA-Polymerasen genutzt werden. Voraussetzung für die Enzymaktivität der Polymerasen ist ein 3'-OH-Ende doppelsträngiger DNA. Dieses wird künstlich durch die Anlagerung von kurzen Oligonukleotiden (Primer) geschaffen. Primer sind ca. 17 bis 28 Nukleotide lang und flankieren das DNA-Fragment. Es werden zwei Primer verwendet, einer bindet an den *sense*-Strang, der zweite an den *antisense*-Strang der DNA. Somit erfolgt eine exponentielle Amplifikation. Jeder Primer besitzt eine optimale Annealing-Temperatur. Diese kann durch die Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) annähernd bestimmt werden.

$$T_m = 64,9^\circ\text{C} + (41^\circ\text{C} \cdot (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C} - 16,4) / N)$$

N: Basenpaare des Primers

Die PCR besteht aus drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden, auf Grund dessen wird das DNA-Template exponentiell bis zu einem Faktor von 10^{12} angereichert. Eine PCR setzt sich im Allgemeinen aus den folgenden Schritten zusammen:

1. Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird bei 94°C denaturiert, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen.
2. Annealing: Die Temperatur wird herabgesenkt, damit die Primer an komplementäre DNA-Sequenzen binden können. Hierbei wird die jeweilige optimale Annealing-Temperatur der Primer verwendet.

3. Extension: In diesem Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht und die Primer werden durch die DNA-Polymerase verlängert, wobei die Sequenz des DNA-Fragments als Matrize dient.

Aufgrund der Denaturierung bei 94°C wird eine hitzestabile DNA-Polymerase genutzt. In dieser Arbeit wurde die Taq-DNA-Polymerase verwendet, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Die Taq-Polymerase hat ein Temperaturoptimum von 72°C und eine hohe Prozessivität. Im Unterschied zum früher verwendeten Klenow Fragment (exo⁻) aus *Escherichia coli*, das ein Temperaturoptimum von 37°C besitzt, kann der Schritt des Primer-Anlagerns bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Damit wird sichergestellt, dass überwiegend komplementäre Primer-Template-Sequenzen aneinander binden. Dies erhöht die selektive Anreicherung der gewollten DNA-Sequenz und verhindert die Amplifikation unspezifischer Fragmente.

Wichtig für eine hohe Amplifikationsrate sind unter anderem die Pufferbedingungen (Ionen- und Salzkonzentration), die Konzentration der Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und die Auswahl der Primer [Lottspeich *et al.*, 2006; Saiki *et al.*, 1988].

In dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt. Tabelle 3 gibt das allgemein verwendete PCR-Programm wieder.

Tabelle 3: Allgemeines PCR-Programm

1.	Initialisierende Denaturierung	95°C	30 sec
2.	Denaturierung	95°C	2 min
3.	Annealing	53-56°C	1 min
4.	Extension	72°C	1 min
2-15 Zyklen Schritt 2-4			
5.	Denaturierung	95°C	2 min
6.	Annealing	60-70°C	1 min
7.	Extension	72°C	1 min
0-4 Zyklen Schritt 5-7			
8.	Abschließende Extension	72°C	5 min
9.	Endtemperatur	4°C	∞

Die Anzahl der Zyklen sowie die Annealing-Temperaturen wurden für jede PCR angepasst. Die verwendeten Primer mit dazugehöriger Annealing-Temperatur und der Verwendung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Primer mit ihrem Verwendungszweck und der Annealing-Temperatur

Name	Verwendung	Annealing-Temperatur
Gi1Q3	Sequenzierung der RNA-SELEX (QST40-cDNA)	53°C
GiAQ5	Sequenzierung der Gibberellinsäure-RNA-SELEX (QST40-cDNA)	70°C
GiBQ5	Sequenzierung der Histamin-RNA-SELEX (QST40-cDNA)	70°C
GiCQ5	Sequenzierung der Indol-3-essigsäure-RNA-SELEX (QST40-cDNA)	70°C
GiDQ5	Sequenzierung der Folsäure-RNA-SELEX (QST40-cDNA)	70°C
Pro3	Vervielfältigung der DNA-Selektionen (Bank40)	59°C
Pro5	Vervielfältigung der DNA-Selektionen (Bank40)	59°C
T7Pro5	Amplifizierung der Bank40-DNA	59°C
T7QF	Transkription der QST40-Bank in RNA	56°C
QF5	Amplifizierung der QST40-Aptamere für den Diversitätsassay, RT-PCR der QST40-RNA	56°C
QR	Transkription der QST40-Bank in RNA, Amplifizierung der QST40-Aptamere für den Diversitätsassay, RT-PCR der QST40-RNA	65°C

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes gibt Tabelle 5 wieder. Abhängig von der Menge an eingesetzter DNA wurde mit Millipore-Wasser auf 100 µl bzw. 50 µl aufgefüllt. Alle Reagenzien wurden auf Eis pipettiert.

Tabelle 5: Pipettierschema des PCR-Ansatzes

Reagenzien	Volumen [Endkonzentration]	
10x Puffer B (mit MgCl ₂)	10 µl [1x]	5 µl [1x]
dNTPs [2,5 mM]	8 µl [200 µM]	4 µl [200 µM]
Primer 1 [100 µM]	2 µl [2 µM]	2 µl [4 µM]
Primer 2 [100 µM]	2 µl [2 µM]	2 µl [4 µM]
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl [2,5 U]	0,5 µl [2,5 U]
Template-DNA	x µl	0,5 µl
Millipore-H ₂ O	x µl	36 µl
Endvolumen	100 µl	50 µl

Für die RNA-SELEX mit der QST40-Bank musste die DNA in RNA umgeschrieben werden. Zu diesem Zweck wurde die einzelsträngige DNA mit den Primern QR und T7QF amplifiziert. Durch den T7QF-Primer wurde der Promotor für die T7-RNA-Polymerase an die ursprüngliche Sequenz der Nukleinsäurebank angefügt wurde, um im Folgenden die DNA in RNA umzuschreiben. Für die PCR wurden 0,2 nmol der Nukleinsäurebank eingesetzt.

Bei der DNA-SELEX mit Bank40 wurden die selektierten Sequenzen mittels PCR vervielfältigt. In dieser 15 Zyklen umfassenden PCR wurden die Primer Pro3 und Pro5 verwendet. Der 100 µl Ansatz wurde geteilt, wobei 50 µl als offene Kontrolle dienten und die restlichen 50 µl mit 300 µl Emulsions-Mix versehen wurden. Nachdem die Proben mit Emulsions-Mix 5 min bei 4°C geschüttelt wurden, wurden diese in jeweils drei PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach der PCR wurden diese wieder zusammengeführt und aufgereinigt.

Um die Proben der RNA-SELEX zu sequenzieren, wurde die cDNA in sieben Zyklen mit den Primern Gi1Q3 und dem jeweiligem GiQ5-Primer in einer Emulsions-PCR amplifiziert und die Adaptorenssequenzen für die SOLEXA-Sequenzierung an die Nukleinsäurefragmente angefügt.

Proben für einen Diversitätsassay wurden in Emulsion mit den Primern QF5 und QR für die QST40-Aptamere aus der RNA-SELEX und T7Pro5 und Pro3 für die Bank40-Aptamere amplifiziert.

2.2.3. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

In einer RT-PCR wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und amplifiziert. Die RT-PCR besteht aus zwei Schritten. Im Ersten erfolgt die reverse Transkription der RNA in cDNA, im zweiten Schritt wird die cDNA vervielfältigt [Lottspeich *et al.*, 2006]. In dieser Arbeit wurde anstelle einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), wie zum Beispiel der Tth-DNA-Polymerase, die Taq-DNA-Polymerase zur Herstellung der cDNA verwendet. Grabko *et al.* [1996] untersuchten anhand von Virus-RNA die Aktivität der beiden Polymerasen und konnten zeigen, dass bei der Verwendung der Taq-DNA-Polymerase die gewünschten RNA-Fragmente in höheren Mengen amplifiziert wurden. Die Taq-DNA-Polymerase verfügte dabei um eine 100mal höhere Aktivitätsrate als die Tth-DNA-Polymerase.

Beide Schritte der RT-PCR wurden direkt nacheinander ausgeführt. Die Zusammensetzung des RT-PCR Ansatzes (Tabelle 6) erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Roboklon, Berlin).

Tabelle 6: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
RNA-Template	5 µl	
QR-Primer [100 µM]	0,2 µl	20 pmol
Tris-HCl (pH 8,8) [1 M]	1,34 µl	67 mM
MnCl ₂ [0,1 M]	0,4 µl	2 mM
dNTPs [2,5 mM]	2 µl	250 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄ [0,5 M]	0,66 µl	16,6 mM
Tween20 (1%)	0,2 µl	0,01%
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl	5 U
Millipore-H ₂ O	9,2 µl	
Endvolumen	20 µl	

Der Reaktionsansatz wurde 3 min bei 56°C in einem Thermozykler inkubiert. In diesem Temperaturschritt lagerten sich die Primer an. Im Weiteren erfolgte die reverse Transkription für 10 min bei 70°C.

Zur Vervielfältigung der cDNA erfolgte eine PCR mit 15 Zyklen. Dafür wurden zu dem 20 µl-Ansatz weitere 80 µl hinzu gegeben mit folgenden Reagenzien (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Amplifikation der cDNA

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
EGTA [5 mM]	15 µl	0,75 mM
10xPCR-Puffer A	10 µl	1x
QR-Primer [100 µM]	0,8 µl	80 pmol
QF5-Primer [100 µM]	1 µl	100 pmol
dNTPs [2,5 mM]	8 µl	200 µM
MgCl ₂ [25 mM]	8 µl	2 mM
Millipore-H ₂ O	37,2 µl	
Endvolumen	80 µl	

Das Gesamtvolumen der Proben betrug nun 100 µl. Von diesen wurden 50 µl abgenommen und 300 µl Emulsions-Mix hinzu gegeben. Die restlichen 50 µl dienten als offene Kontrolle

ohne Emulsions-Mix. Dann wurde eine PCR durchgeführt mit 15 Zyklen, das Programm ist Tabelle 3 zu entnehmen.

2.2.4. Synthese doppelsträngiger DNA mit dem Klenow Fragment

Für die Amplifikation der T7G340C3 Nukleinsäurebank mit der Q-Beta RNA-Polymerase musste diese zunächst in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Klenow Fragments (exo⁻). Die DNA Polymerase I aus *Escherichia coli* besitzt drei enzymatische Aktivitäten. Am carboxyterminalen Ende liegt die funktionelle Domäne der DNA-Polymerase, in der Mitte eine 3'-5'-Exonuklease und am aminoterminalen Ende eine 5'-3'-Exonuklease. Als Klenow Fragment wird der carboxyterminale Anteil bezeichnet. In dieser Arbeit wurde das Klenow Fragment, welches keine Exonuklease-Aktivität besitzt, verwendet. Die Synthese der DNA erfolgt in 5'-3'-Richtung, wobei die Polymerase an das freie 3'-OH-Ende des verwendeten Primers neue Nukleotide nach der Sequenz des Matrizenstrangs knüpft [Knippers, 2006].

Die DNA wurde vorher bei 94°C für 4 min denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Nach einem fünfminütigem Inkubationsschritt bei 37°C, in dem sich der Primer anlagert, wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 8: Pippetierschema des Reaktionsansatzes

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
10x Klenow-Puffer	5 µl	1x
dNTP [2,5 mM]	5 µl	250 µM
T7P-Primer [100 µM]	1 µl	2 µM
T7G340C3-Bank [0,1 nmol/µl]	0,1 µl	10 pmol
Klenow Fragment (exo-) [10 U/µl]	0,5 µl	5 U
Millipore-H ₂ O	38,4 µl	
Endvolumen	50 µl	

Nach der Aufreinigung konnte die DNA in RNA umgeschrieben werden.

2.2.5. T7 Transkription

Mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase wurde die DNA in RNA transkribiert und amplifiziert.

Die T7-RNA-Polymerase stammt aus dem Bakteriophagen T7, dessen Plasmid in *Escherichia coli* Zellen überexprimiert wird. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa [Knippers, 2006]. Die T7-Polymerase ist hochspezifisch für ihren Promotor, der in Abbildung 20 dargestellt ist. Diese Konsensus-Sequenz dient als Erkennungs- und Bindestelle. Die Polymerase bindet an den Promotor und synthetisiert in 5'-3'-Richtung ungefähr hundert neue RNA-Moleküle pro DNA-Strang. Der Promotor wird dabei nicht mit amplifiziert und die folgenden Guanine dienen als Initiationssequenz [Lottspeich *et al.*, 2006].



Abbildung 20: Die Konsensus-Sequenz des T7-RNA-Polymerase Promoters [Maslak *et al.*, 1993].

Der Reaktionsansatz ist in der folgenden Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung des T7-Reaktionsansatzes

Reagenzien	Volumen [Endkonzentration]	
	QST40-DNA	T7G340C3-DNA
2x T7-Puffer	10 µl [1x]	55 µl [1x]
Nukleinsäurebank	7,9 µl [1,5 µg]	50 µl [1µg]
Enzym-Mix (1 U/µl)	2 µl [2U]	2 µl [2U]
H ₂ O (Nuklease frei)	0,1 µl	3 µl
Endvolumen	20 µl	110 µl

Der T7-Puffer wurde vorher auf 37°C vorgeheizt, um das vorhandene Präzipitat im Puffer zu lösen. Aufgrund der hohen Diversität der Nukleinsäurebank wurden 1,5 µg bzw. 1 µg DNA in die Reaktion eingesetzt.

Die Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend 15 min bei 37°C mit DNase inkubiert, um die eingesetzte DNA abzubauen. Um 1 µg DNA abzubauen wurde 1 U DNase eingesetzt. DNase I ist eine Endonuklease, die aus der Bauchspeicheldrüse von Rindern gewonnen wird. Das Enzym baut die DNA überwiegend sequenzunabhängig ab, indem es die Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden spaltet. Die Enzymaktivität ist abhängig von Magnesiumionen und die Hydrolyse kann durch Zugabe von

EDTA gestoppt werden, da dieses die freien Ionen komplexiert. [Lottspeich *et al.*, 2006; Knippers, 2006]

Die nach der T7-Transkription erhaltenen RNA-Sequenzen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Oligonukleotid-Sequenzen nach dem Umschreiben mit der T7-Polymerase in RNA

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (nt)
QST40	5'-GGG GUU CCA ACC GGA AG 40N CCG GUU UCG GAC CUC CAG UGC GUG UUA CCG CAC UGU UAG CCC-3'	99
qb3.888	5'-GGG GUU CCA ACC GGA AGU UGA CAC CGU ACC UGC UCU AUC UAA UAG GGC AUC CGU ACG UUG UUC UUG ACG AUG CUU CAA GCA CGC CAG GGA CUA UCC GGU UUC GGA CCU CCA GUG CGU GUU ACC GCA CUG UUA GCC C-3'	136
T7G340C3	5'-GGG 40N CCC-3'	46
QBank40	5'-GGG GUU CCA ACC GGA AGU UGA CAC CGU ACC UGC UCU 40N AAG CAC GCC AGG GAC UAU CCG GUU UCG GAC CUC CAG UGC GUG UUA CCG CAC UGU UAG CCC-3'	136

2.2.6. Q-Beta Replikation

Zur Vervielfältigung von RNA wurde die RNA-abhängige Q-Beta RNA-Polymerase verwendet. Diese amplifiziert RNA ohne einen Primer oder Promoter zu benötigen. Die Polymerase kopiert einzelsträngige RNA exponentiell [Weissmann *et al.*, 1968].

Die Tabelle 11 zeigt den Reaktionsansatz, wobei die eingesetzten RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Versuchen variierten.

Tabelle 11: Pipetierschema der Q-Beta Amplifikation

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
10x NE Puffer	5 µl	1x
NTP [25 mM]	5 µl	2,5 mM
RNA-Template	x µl	
Q-Beta Replikase [1 U/µl]	1 µl	1 U
Millipore-H ₂ O	x µl	
Endvolumen	50 µl	

Vor der Zugabe des Enzyms in den Reaktionsmix wurde die RNA bei 94°C für 3 min inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Von den 50 µl Endvolumen wurden 2 µl als offene Kontrolle abgenommen. Die verbleibenden 48 µl wurden mit Emulsions-Mix versehen. Die Q-Beta Replikation wurde für vier Stunden bei 25°C durchgeführt.

Es wurden Versuche durchgeführt, um die RNA-Vervielfältigung mit der Q-Beta Replikase zu optimieren. Untersucht wurde die Replikationseffizienz von verschiedenen Nukleinsäurebanken in Bezug auf die Inkubationszeit und Inkubationstemperatur. Tabelle 12 und 13 zeigen die getesteten Parameter.

Tabelle 12: Gesamtmenge an RNA bzw. DNA der Nukleinsäurebanken

Gesamtmenge an RNA / DNA	Nukleinsäurebank			
	QST40	QBank40	T7G340C3	G340C3
0,01 ng	+	+		
0,1 ng	+	+	+	+
1 ng	+	+	+	+
10 ng	+	+	+	+
100 ng			+	+
1000 ng			+	+

Tabelle 13: Analyse der Temperatur und der RNA-Gesamtmenge in Bezug auf die Zeit

Zeit (h:min)	Temperatur (1 ng QST40-RNA)			Gesamtmenge an QST40-RNA		
	25°C	30°C	37°C	1 ng	0,1 ng	0,01 ng
0:00	+	+	+	+	+	+
0:30	+	+	+			
1:00	+	+	+			
2:00	+	+	+	+	+	+
2:30				+	+	+
3:00				+	+	+
3:30				+	+	+
4:00	+	+	+	+	+	+

2.2.7. Partikel-Kopplung

Zur Selektion von Aptameren gegen bestimmte Moleküle wurden die Zielmoleküle kovalent an magnetische Partikel gebunden. Gibberellinsäure, Indol-3-essigsäure und Folsäure enthalten alle eine Carboxylgruppe (COOH) und wurden an Partikel immobilisiert, welche eine Aminogruppe (NH₂) enthielten. Histamin besitzt eine Aminogruppe und wurde an Carboxylgruppen-tragende Partikel gebunden.

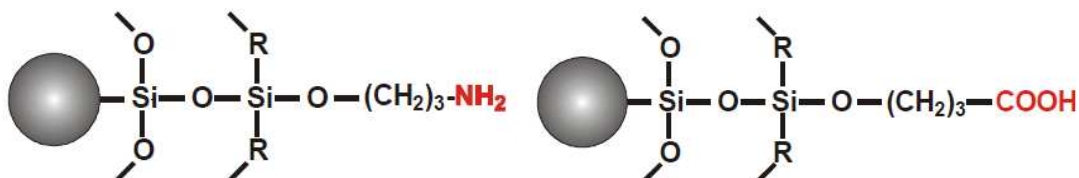


Abbildung 21: Schematische Darstellung der magnetischen Partikel. Links: die SiMAG-Amin-Partikel, rechts die SiMAG-Carboxyl-Partikel. [Chemicell, Produkt Information].

Verwendet wurden magnetische Partikel von Chemicell (Berlin) mit einem Durchmesser von 0,5 μm bis 1 μm . Die Kügelchen besaßen eine Dichte der funktionellen Gruppen von 850 $\mu\text{mol COOH/g}$ bzw. 350 $\mu\text{mol NH}_2/\text{g}$. Zur Kopplung der Liganden mit den Partikeln wurde EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl] Carbodiimid Hydrochlorid) eingesetzt. EDC reagiert mit Carboxylgruppen zu einem Aminreaktiven O-Acylcarbamid Zwischenprodukt. Dieses Zwischenprodukt reagiert mit einer Aminogruppe und formt dabei mit der Carboxylgruppe eine kovalente Aminbindung (Abbildung 22) [Grabarek *et al.*, 1990].

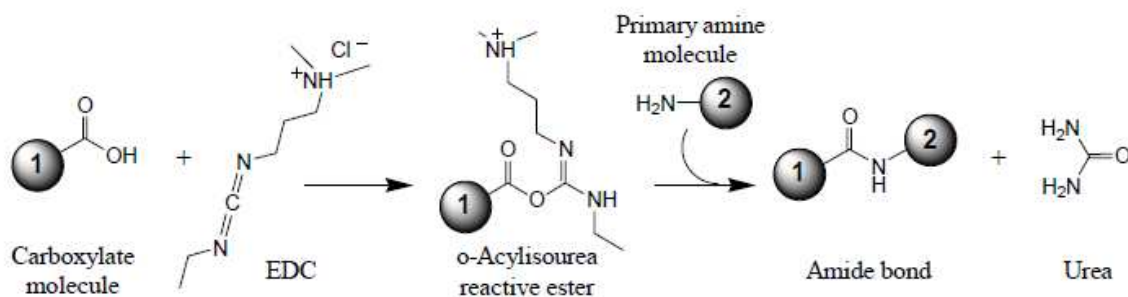


Abbildung 22: Chemische Aktivierung der funktionellen Gruppe der Carboxyl-Partikel durch EDC und kovalente Bindung der Liganden. 1: Partikel mit Carboxylgruppe; 2: Ligand mit Aminogruppe [Thermo Scientific, Produkt Information].

In Anlehnung an das Protokoll des Herstellers wurden die Liganden auf den Partikeln immobilisiert.

10 mg Partikel besitzen 3,5 $\mu\text{mol NH}_2$ - bzw. 8,5 $\mu\text{mol COOH}$ -Gruppen auf der Oberfläche. Damit möglichst alle funktionellen Gruppen nach der Kopplung mit einem Liganden besetzt sind, wurden 20 mM des gelösten Liganden für Reaktion eingesetzt. Die Moleküle wurden in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Vor der Immobilisierung wurden 200 μl Partikel (entspricht 10 mg) zweimal mit je 400 μl MES-Puffer (0,1 M, pH 6,0 bzw. pH 5,0) gewaschen. Als nächstes wurden 250 μl MES-Puffer (0,2 M) mit 10 mg EDC versetzt und zu den resuspendierten Partikeln gegeben. 250 μl der Ligandensuspension (20 mM) wurden hinzu gegeben und zwei Stunden bei RT auf dem Rotator (20 rpm) inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1ml SELEX-Bindungspuffer gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

2.2.8. SELEX

2.2.8.1. RNA SELEX

Von der RNA-Bibliothek QST40 wurden 7,38 µl (entspricht 5 µg) mit 10 µl Bindungspuffer versetzt und mit Millipore-Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die RNA wurde bei 94°C denaturiert und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 50 µl magnetische Partikel mit dem gekoppelten Liganden hinzugefügt und für 30 min auf dem Rotator (20 rpm) bei RT inkubiert. Mit 200 µl Bindungspuffer wurde zweimal für 5 min bei RT und unter Rotation gewaschen. Nach Abnahme des Bindungspuffers wurde mit 50 µl Millipore-Wasser bei 70°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit einem Spektrophotometer gemessen. Bei der Aptamerselektion gegen Folsäure wurde ein Absorptionsmaximum von 280 nm festgestellt. Dies entspricht dem der Folsäure. Um eine effiziente Replikation mit der Q-Beta Replikase zu erreichen, wurde diese Probe zusätzlich vor der Amplifikation aufgereinigt. Die Vervielfältigung mittels der Q-Beta Replikase erfolgte in Emulsion, wobei 2 µl als offene Kontrolle abgenommen wurden. Anschließend erfolgten die Aufreinigung und eine Agarose-Gelelektrophorese.

In den folgenden Selektionen wurden 24 µl der angereicherten Nukleinsäurefragmente aus den vorangehenden Selektionen eingesetzt. Das Volumen der Partikel wurde in der zweiten Runde auf 30 µl herabgesetzt, bzw. in der dritten Runde auf 20 µl, um die Stringenz zu erhöhen. In der ersten Selektionsrunde erfolgten zwei Waschschrte, bei der Zweiten drei und bei der dritten Selektionsrunde wurde viermal gewaschen.

In einer vierten Selektionsrunde wurde das Volumen der Partikel nochmals auf 10 µl herabgesetzt sowie die Anzahl der Waschschrte auf fünf erhöht. Es wurden 200 ng aus der dritten Selektion eingesetzt. Die Selektion wurde mit Hilfe des „KingFisher Flex“ durchgeführt. Zur Elution wurden 60 µl Millipore-Wasser verwendet. Die vierte Selektionsrunde diente gleichzeitig als Bindungskontrolle der in den ersten drei Runden selektierten RNA-Aptameren. Dazu wurden die Aptamere, welche gegen Folsäure selektiert wurden auf magnetische Partikel mit gebundener Gibberelinsäure gegeben. Die Gibberelinsäure-Aptamere wurden auf Partikel mit immobilisierter Indol-3-essigsäure und die Indol-3-essigsäure-Aptamere wurden auf Partikeln mit gebundenen Folsäuremolekülen gegeben. Die selektierten Histamin-Aptamere wurden mit unbeladenen Carboxyl-Partikeln inkubiert. Proben, bei denen die Folsäurepartikel verwendet wurden, wurden vor der Amplifikation aufgereinigt.

2.2.8.2. DNA SELEX

Zur Selektion von DNA-Aptameren wurde die Nukleinsäurebank QBank40 verwendet. Die Selektionen wurden mit dem Magnetpartikelprozessor „KingFisher Flex“ durchgeführt (Anhang 6.1.). Von der Bank40 wurden 10 µg DNA in der ersten Selektionsrunde eingesetzt. Mit Bindungspuffer wurde auf 100 µl aufgefüllt und bei 94°C 3 min denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 500 µl Bindungspuffer und 75 µl der mit den Liganden gekoppelten Partikel hinzugegeben und 30 min inkubiert. Nach einem fünfminütigem Waschschrift mit 600 µl Bindungspuffer erfolgte die Elution mit 80 µl EDTA (1 mM) bei 70°C für 10 min. Amplifiziert wurde die DNA in einer Emulsions-PCR, wobei 50 µl der Proben als offene Kontrolle dienten. Die folgenden Selektionen wurden mit einigen Veränderungen zur Erhöhung der Stringenz nach demselben Protokoll durchgeführt. In der zweiten Selektionsrunde wurden 500 ng aus der ersten Selektionsrunde der Gibberellinsäure- und der Folsäure-SELEX eingesetzt. Von der Histamin- und der Indol-3-essigsäure-SELEX konnten nur 100 ng eingesetzt werden. Wie schon bei der RNA-SELEX wurde die Anzahl der Waschschrift erhöht auf zwei und nur noch 50 µl Partikel zur Inkubation verwendet. In der dritten Selektionsrunde wurde 100 ng DNA eingesetzt und ein weiterer Waschschrift hinzugefügt. Auch die Menge an magnetischen Partikeln wurde auf 25 µl herab gesetzt.

2.2.9. Diversitätsassay

Um den Erfolg der Selektionen zu überprüfen, wurde ein Diversitätsassay nach Schütze *et al.* [2010] durchgeführt. In diesem kann anhand der Rückschmelzkurven von doppelsträngiger DNA die Abnahme der Diversität der Nukleinsäurebank beobachtet werden. Sind die Selektionen erfolgreich, sollten sich Aptamere anreichern und so zu einer Abnahme der Diversität führen.

Die Proben werden dafür erst denaturiert, dann erfolgt für drei Stunden die erneute Anlagerung. Während des wiederholten Schmelzens wird die Fluoreszenz gemessen. Als Nachweis wird ein fluoreszierender Farbstoff, wie zum Beispiel SYBRGreen I, verwendet. SYBRGreen I bindet doppelsträngige DNA mit höherer Präferenz als einzelsträngige DNA. Anhand der Stärke des Signals kann so die Menge an doppelsträngiger DNA bestimmt werden [Mülhardt, 2009]. Eine hohe Diversität führt dabei zu einer erniedrigten Schmelztemperatur aufgrund der Ausbildung von Heteroduplexen. Bei einer Abnahme der Diversität erhöht sich die Schmelztemperatur. In der Abbildung 23 wird deutlich, dass sich bei einer niedrigen Diversität die Graphen nach rechts verschieben. Eine genauere Vorhersage wie viele unterschiedliche Moleküle in den Proben enthalten sind, kann durch den Vergleich mit einem Standard erfolgen. Als Beispiel zeigt die Abbildung 23 die Rückschmelzkurven eines Diversität-Standards der 70 bp lang ist und eine unterschiedliche

Anzahl an zufällig ausgewählten Nukleotiden enthält. Als Bezug wurde die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Zeit gewählt.

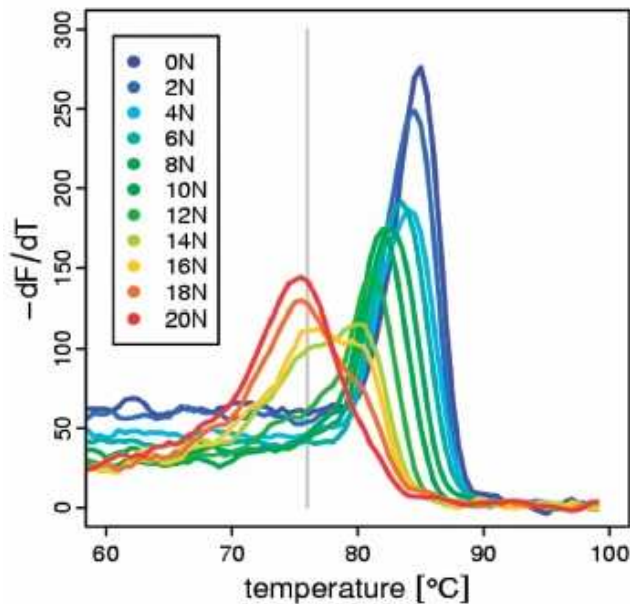


Abbildung 23: Darstellung der Rückschmelzkurven des Diversität-Standards [Schütze, 2010].

Der Diversitätsassay wurde in einem Light Cycler (Roche) durchgeführt. Von den Proben wurden jeweils 300 ng eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SybrGreen I (1:10.000) und 1 μ l 10x DA-Puffer verwendet. Das Endvolumen betrug 10 μ l. Alle drei Selektionsrunden der RNA- und der DNA-SELEX wurden überprüft. Außerdem wurden als Vergleichswert die vollständigen Nukleinsäurebanken eingesetzt. Die Denaturierung erfolgte für 2 min bei 98°C, der Anlagerungsschritt wurde für drei Stunden bei 76°C durchgeführt. Der Rückschmelzvorgang startete bei 20°C und erhöhte sich pro Zyklus um 0,5°C auf 98°C, wobei ein Zyklus sieben Sekunden entsprach.

Zur Untersuchung, ob die Q-Beta-Replikase Sequenzen bei der Replikation bevorzugt, wurde ein Diversitätsassay von drei aufeinander folgenden Replikationen der QST40-Nukleinsäurebank durchgeführt. In die erste Replikation wurde 1 ng RNA der QST40-Nukleinsäurebank eingesetzt. Aus dem daraus resultierenden Nukleinsäurepool wurde 1 ng in die zweite und von der zweiten wiederum 1 ng in die dritte Replikation eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug drei und vier Stunden bei 25°C. Die Reaktionen wurden jeweils in Emulsion und ohne Emulsion durchgeführt. Die RNA wurde in cDNA transkribiert.

Der Diversitätsassay wurde nach dem zuvor beschriebenen Protokoll, sowohl mit den RNA-, als auch mit den cDNA-Proben, durchgeführt.

2.2.10. Aufreinigung der DNA- und RNA-Proben

Zur Isolation der Nukleinsäuren aus den Reaktionsansätzen wurde das sbeadex DNA Isolation Kit von Agowa genomic (Berlin) oder das EURx „PCR Clean Up DNA – Purification Kit“ von Roboklon (Berlin) verwendet. Das EURx-Kit wurde zur Aufreinigung von DNA ab 100 bp benutzt und besteht aus Säulen mit einer Silikatmembran. Bei Zugabe von chaotropen Salzen in hohen Konzentrationen wird die DNA an den Silika-Oberflächen adsorbiert. Durch Waschschrte werden ungewollte Reagenzien wie Ethidiumbromid, Primer, RNA, Enzyme, Detergenzien, sowie Salze und Puffer entfernt. Danach kann die DNA durch Puffer mit niedrigem Salzgehalt und einem höherem pH-Wert gelöst werden [Mülhardt, 2009; Roboklon, Produkt Information].

Die zur Aufreinigung verwendeten Partikel sind paramagnetische Kugeln, die erst durch ein extern angelegtes magnetisches Feld magnetisiert werden. An die speziell beschichteten Partikel binden Nukleinsäuren und unter Verwendung eines Magneten bleiben die Teilchen am Rand des Gefäß haften, während der Überstand verworfen werden kann. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Zentrifugation nötig ist und wenig mechanische Scherkräfte auf die Proben wirken. Außerdem müssen keine toxischen Reagenzien eingesetzt werden. Des Weiteren können Proben im Hochdurchsatz mit Hilfe eines Magnetpartikelprozessors aufgereinigt werden [Lottspeich *et al.*, 2006; Mülhardt, 2009]. In dieser Arbeit wurde der „KingFisher Flex“ von Thermo Scientific genutzt. Das Protokoll des Magnetpartikelprozessors befindet sich in Abschnitt 6.2. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des „sbeadex DNA Isolation Kit“ und wurde wie folgt durchgeführt.

Bei Reaktionen, die in Emulsion stattfanden, wurde vor der Aufreinigung 1 ml Isobutanol zum Aufbruch der Emulsion hinzu gegeben. Durch das begrenzte Volumen der im Magnetpartikelprozessor verwendeten Mikrotiterplatten wurden diese Proben geteilt und nach der Elution wieder zusammengeführt. Zu den geteilten Emulsionsproben wurden jeweils 100 µl Bindungspuffer und 15 µl magnetische Partikel gegeben. Die Bindung erfolgte für 30 min. Gewaschen wurde erst mit 400 µl Waschpuffer und dann mit 400 µl Millipore-Wasser für jeweils 10 min. Die Nukleinsäuren wurden bei 65°C für 30 min in 35 µl Elutionspuffer von den Partikeln gelöst.

Bei der Aufreinigung von Proben ohne Emulsion wurden 160 µl Bindungspuffer und 20 µl Partikel verwendet. Die Elution erfolgte mit 65 µl Elutionspuffer. Die Waschschrte und die Inkubationszeiten wurden beibehalten.

2.2.11. Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Quantität und Qualität von RNA- und DNA-Proben wurden mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Mit dessen Hilfe kann die Optische Dichte (OD) von Proben bestimmt und damit die Konzentrationen von Nukleinsäuren ab 2 ng/µl gemessen werden. DNA und RNA besitzen ein Absorptionsmaximum von 260 nm, allerdings bestehen Unterschiede in der Absorption von einzelsträngiger DNA zu doppelsträngiger DNA. Die aromatischen Ringe sind für die Absorption verantwortlich, aufgrund dessen besteht auch ein Unterschied zwischen RNA und DNA, da RNA aus Uracil statt Thymin aufgebaut ist (Abbildung 24) [Lottspeich *et al.*, 2006].

1 OD _{260nm} =	50 µg/ml	dsDNA
	40 µg/ml	ssDNA
	33 µg/ml	ssRNA

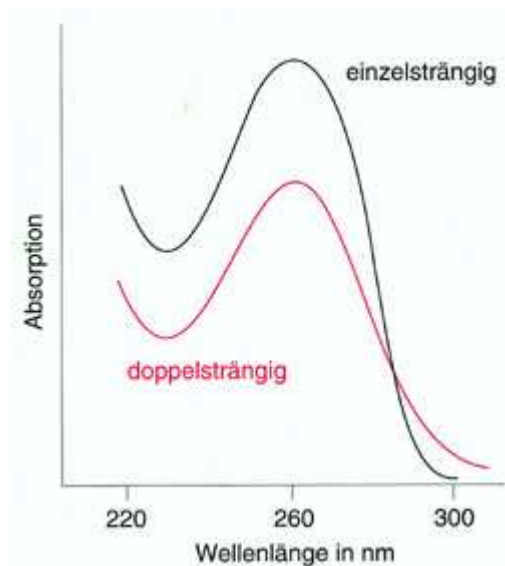


Abbildung 24: Absorptionskurven von einzel- und doppelsträngiger DNA [Lottspeich *et al.*, 2006].

Vor den Messungen wurde als Nullprobe jeweils der Puffer verwendet, in dem die DNA bzw. RNA gelöst wurde. Gemessen wurde in einem Volumen von 1 µl. Die Reinheit der Proben konnte an den Absorptions-Koeffizienten 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm abgelesen werden. Ein Zahlenverhältnis von 1,8 (DNA) bzw. 2,0 (RNA) des Koeffizienten 260/280 zeigt an, dass die Probe nicht verunreinigt ist. Der 260/230-Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Bei Abweichungen könnten die Proben Kontaminationen enthalten, wie zum Beispiel Alkohole oder Partikel [PEQLAB, Produkt Information].

2.2.12. Agarosegel-Gelelektrophorese

Elektrophorese wird der Vorgang genannt, bei dem geladene Teilchen durch ein elektrisches Feld wandern. Abhängig von Ladung und Größe bewegen sich die Teilchen unterschiedlich schnell. Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid, das nach dem Aufkochen in Wasser eine netzartige Struktur bildet. Je nach aufzutrennendem Material wird die Konzentration der Agarose, der Laufpuffer, der Farbstoff, sowie die Spannung des elektrischen Feldes angepasst. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen von Nucleinsäuren laufen diese immer in Richtung der Anode. Zu beachten bei der Auftrennung von RNA und einzelsträngiger DNA ist, dass Agarosegele keine Sekundärstrukturen auflösen [Lottspeich *et al.*, 2006].

In dieser Arbeit wurden dreiprozentige Agarosegele hergestellt, wozu TBE-Puffer verwendet wurde und unter anlegen einer Spannung von 80 Volt die Nucleinsäuren aufgetrennt wurden. Zur Detektion wurde Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridiniumbromid) genutzt. Dieses besitzt ausgehend von seiner planaren Struktur die Fähigkeit in Nucleinsäuren zu interkalieren. Die aromatischen Ringe des organischen Farbstoffs interagieren mit den heteroaromatischen Ringen von DNA und RNA. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal erhöht und die Nucleinsäuren können mit Hilfe von UV-Licht auch gegenüber dem frei vorliegenden Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Wobei zu berücksichtigen ist, dass einzelsträngige DNA und RNA eine geringere Quantenausbeute zeigen [Lottspeich *et al.*, 2006]. Die Höhe der nachweisbaren Menge an DNA pro Bande mit Ethidiumbromid liegt bei ca. 5 ng [Mülhardt, 2009].

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden eine RNA- und eine DNA-SELEX für die Moleküle Gibberellinsäure, Histamin, Indol-3-essigsäure und Folsäure durchgeführt.

Die RNA-Aptamere wurden mit der Q-Beta Replikase vervielfältigt. Weiterhin wurden drei Selektionsrunden vorgenommen und die angereicherten Sequenzen mit der SOLEXA-Technologie von Illumina analysiert. Die Selektionen der DNA-SELEX wurden mit einem Magnetpartikelprozessor durchgeführt. In einem Diversitätsassay konnte die Anreicherung von Nukleinsäuresequenzen in den Selektionen überprüft werden. Des Weiteren wurde die Q-Beta Replikation auf ihre Effizienz in Bezug auf verschiedene Parameter untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der DNA- und RNA-SELEX, der Diversitätsanalysen, der Sequenzierung und der Q-Beta Replikationsoptimierung dargestellt.

3.1. SELEX

3.1.1. RNA-SELEX

Die RNA-SELEX wurde mit der QST40-Bibliothek durchgeführt. Nachdem die Bibliothek in RNA transkribiert wurde, besaßen die Nukleinsäurefragmente eine Länge von 99 Nukleotiden (siehe Abschnitt 2.2.5.). Die Amplifikation der selektierten Sequenzen erfolgte mit der RNA-abhängigen Q-Beta Replikase.

Im Folgenden werden die Aptamer-Proben nach ihrem Zielmolekül benannt und Proben, welche nicht in Emulsion amplifiziert wurden, werden als „offene Kontrolle“ bezeichnet.

Die Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Q-Beta Amplifikation der selektierten Nukleinsäurefragmente aus der ersten Selektionsrunde. In allen offenen Kontrollen ist die erwartete Bande, welche bei ca. 100 bp liegt, zu sehen. Die offenen Kontrollen zeigen eine weitere Bande bei etwa 60 bp. Die Banden der Amplifikation in Emulsion sind schwächer, aber für Histamin und Indol-3-essigsäure zu erkennen. In der Abbildung 25 zeigt sich bei der geschlossenen Amplifikation der Gibberellinsäure-Aptamere keine, bei den Folsäure-Aptameren nur eine sehr schwache Bande. Allerdings wurden die Folsäure-Aptamere vor der Q-Beta Replikation aufgereinigt.

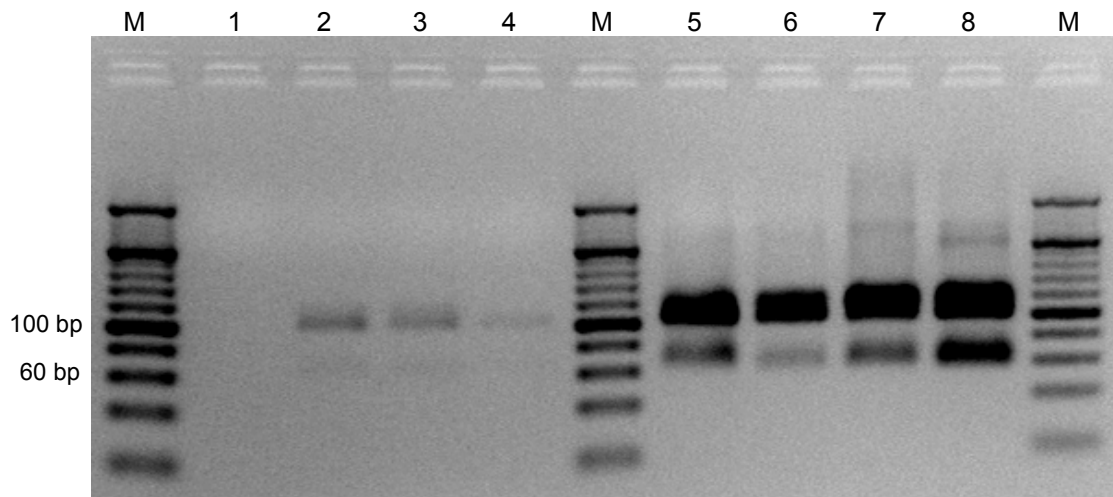


Abbildung 25: Q-Beta Amplifikation der ersten Selektionsrunde der RNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; 5) Gibberellinsäure, offene Kontrolle; 6) Histamin, offene Kontrolle; 7) Indol-3-essigsäure, offene Kontrolle; 8) Folsäure, offene Kontrolle

Die Abbildung 26 stellt die Absorption der Folsäure-Probe, vor und nach der Aufreinigung, dar. Vor dem Aufreinigen der Probe ist ein deutliches Absorptionsmaximum bei 280 nm zu erkennen, welches dem der Folsäure entspricht. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm. Nach der Aufreinigung ist das gewünschte Maximum von 260 nm zu sehen. Anscheinend wurde Folsäure von den Partikeln mit abgelöst. Bei vorangegangenen Versuchen konnte keine effiziente Replikation der angereicherten Nukleinsäuren erzielt werden. Daher wurden die Folsäure-Proben vor der Amplifikation aufgereinigt.

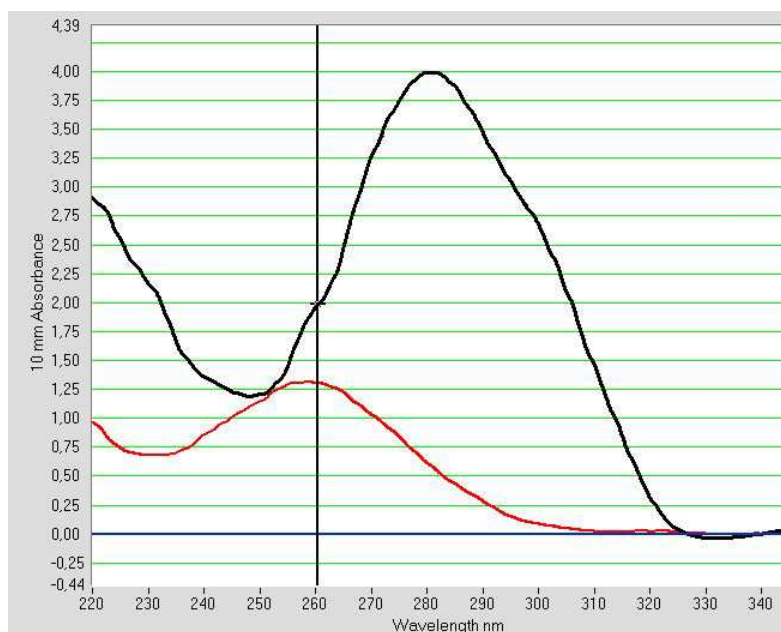


Abbildung 26 : Absorptionsmaxima der Folsäure-Aptamere nach den Selektionsrunden. Vor (schwarze Kurve) und nach (rote Kurve) der Aufreinigung.

Die in der ersten Selektionsrunde angereicherten Nukleinsäurefragmente wurden in die zweite Selektion eingesetzt. In Abbildung 27 ist bei allen Proben die erwartete Bande in Höhe von 100 bp zu detektieren. Die Folsäure-Aptamere, welche in Emulsion amplifiziert wurden, zeigen eine starke Bande im Vergleich zu den anderen Emulsionsproben. Diese weisen nur sehr schwache Banden auf. Alle offenen Kontrollen besitzen eine Bande bei ca. 60 bp. Des Weiteren zeigen die geschlossene und offene Folsäure-Probe eine Bande bei über 200 bp.

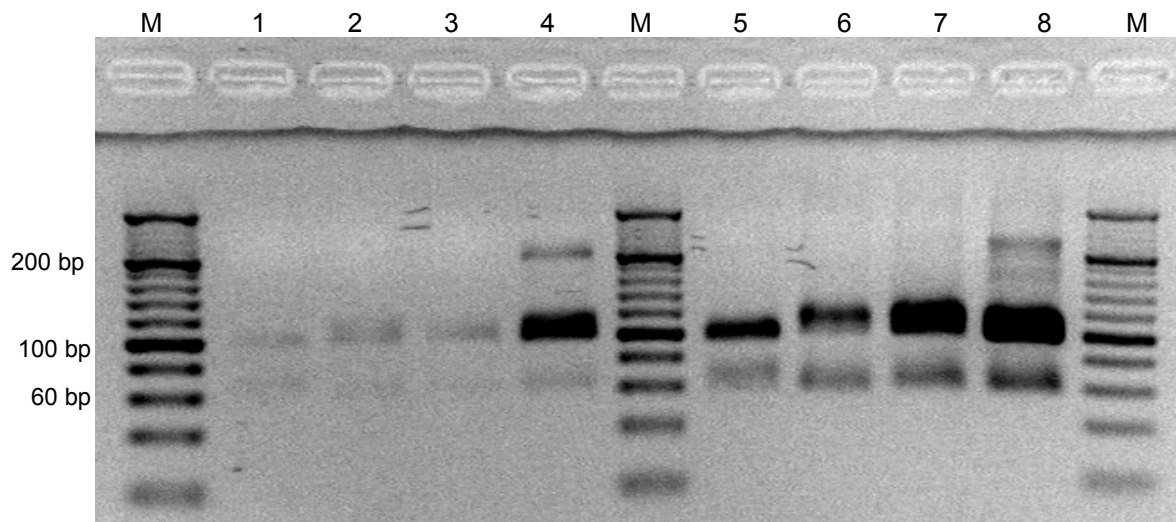


Abbildung 27: Q-Beta Amplifikation der zweiten Selektionsrunde der RNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; 5) Gibberellinsäure, offene Kontrolle; 6) Histamin, offene Kontrolle; 7) Indol-3-essigsäure, offene Kontrolle; 8) Folsäure, offene Kontrolle

Auch in der dritten Selektionsrunde (Abbildung 28) zeigen sowohl die offenen Kontrollen, als auch die in Emulsion amplifizierten Proben, die erwartete 100 bp Bande. Ebenfalls zu erkennen sind die schon beschriebenen 60 bp und über 200 bp großen Banden.

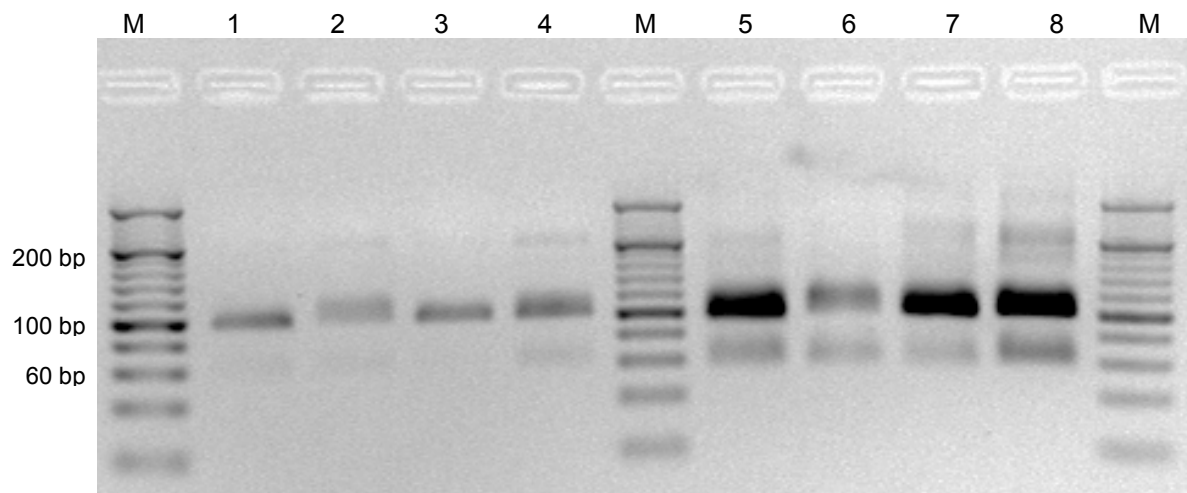


Abbildung 28: Q-Beta Amplifikation der dritten Selektionsrunde der RNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; 5) Gibberellinsäure, offene Kontrolle; 6) Histamin, offene Kontrolle; 7) Indol-3-essigsäure, offene Kontrolle; 8) Folsäure, offene Kontrolle

Eine vierte Selektionsrunde wurde als Bindungskontrolle durchgeführt. Die bis dahin selektierten Aptamere wurden mit anderen Zielmolekülen inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.8.1.). Binden alle Oligonukleotide spezifisch an ihr Zielmolekül, sollte bei den Bindungskontrollen keine Bande detektierbar sein. Die Abbildung 29 zeigt die gelelektrophoretische Auswertung der vierten Selektion. Es ist bei allen Proben eine Bande von 100 bp erkennbar. Die Bindungskontrolle der Folsäure-Aptamere zeigt eine schwächere Bande, als die Folsäure-Aptamere, welche mit Folsäure inkubiert wurden. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch bei den Histamin-Aptameren. Die Banden der Bindungskontrollen von Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure sind stärker ausgeprägt als bei den Aptameren, welche mit ihrem jeweiligen Zielmolekül inkubiert wurden.

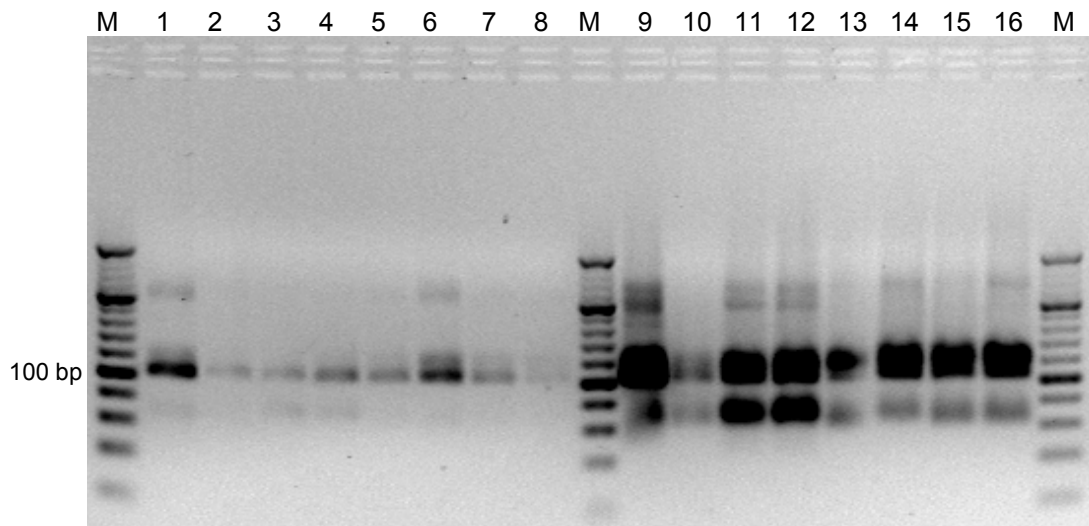


Abbildung 29: Q-Beta Amplifikation der vierten Selektionsrunde der RNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Folsäure; 2) Bindungskontrolle der Folsäure-Aptamere; 3) Gibberellinsäure; 4) Bindungskontrolle der Gibberellinsäure-Aptamere; 5) Indol-3-essigsäure; 6) Bindungskontrolle der Indol-3-essigsäure-Aptamere; 7) Histamin; 8) Bindungskontrolle der Histamin-Aptamere; 9) bis 16) offenen Kontrollen der Proben, in gleicher Reihenfolge dargestellt wie die Emulsionsproben

3.1.2. DNA-SELEX

Zur Selektion der DNA-Aptamere wurde die 76 Basen lange Bank40 verwendet. Der SELEX-Startpool besaß eine Diversität von 10^{14} Nukleinsäuremolekülen. Die Selektionen und Aufreinigungen wurden mit dem Magnetpartikelprozessor „KingFisher Flex“ durchgeführt. Amplifiziert wurden die in den Selektionsrunden gewonnenen Oligonukleotide mittels Emulsions-PCR.

Die Abbildung 30 zeigt die gelelektrophoretische Auswertung der Emulsions-PCR von den selektierten Oligonukleotiden der ersten Selektionsrunde. Bei allen geschlossenen amplifizierten Aptamer-Proben ist die erwartete Bande von rund 80 bp zu sehen. Zusätzlich zu den Negativkontrollen und der Positivkontrolle wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass die Emulsion während der PCR stabil bleibt, wurde erst nach der Zugabe des Emulsions-Mix die Taq-DNA-Polymerase hinzugegeben. Würden die Mizellen während der Amplifikation aufbrechen, sollte eine 80 bp Bande zu sehen sein. In der Abbildung 30 ist keine Bande in der Emulsions-Kontrolle detektierbar. Somit ist die Emulsion stabil.

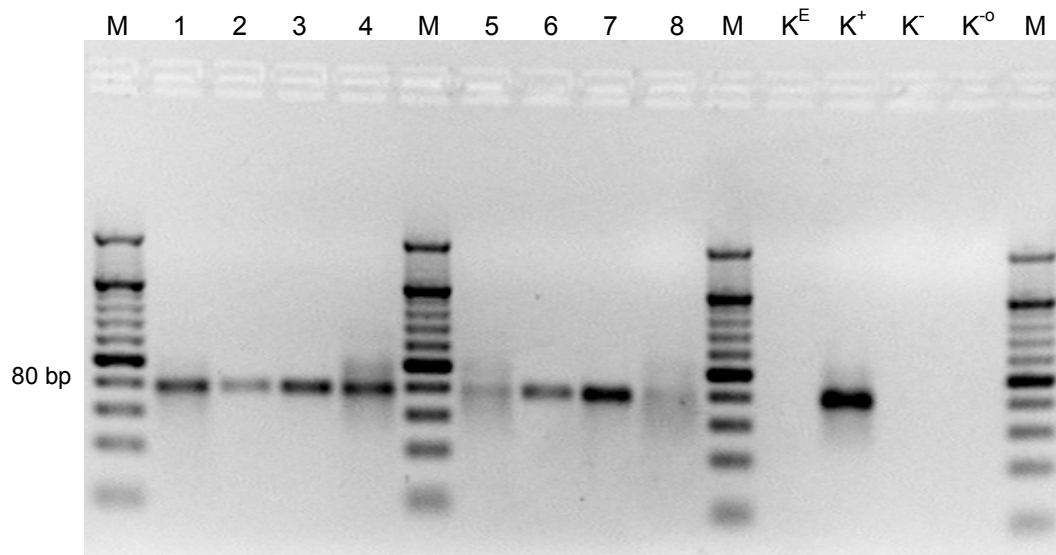


Abbildung 30: Emulsions-PCR der ersten Selektionsrunde der DNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; 5) Gibberellinsäure, offene Kontrolle; 6) Histamin, offene Kontrolle; 7) Indol-3-essigsäure, offene Kontrolle; 8) Folsäure, offene Kontrolle; K^E) Enzymzugabe nach dem Emulsions-Mix (Bank40, 1ng); K^+) geschlossene Positivkontrolle (Bank40; 1ng); K^-) geschlossene Negativkontrolle; K^0) offene Negativkontrolle

Die Agarose-Gelelektrophorese der Emulsions-PCR von der zweiten Selektionsrunde ist in der Abbildung 31 dargestellt. Gibberellinsäure und Histamin zeigen in den geschlossenen amplifizierten Proben keine Bande. Nach einer erneuten PCR zeigten beide Proben eine schwache Bande (Bild nicht gezeigt).

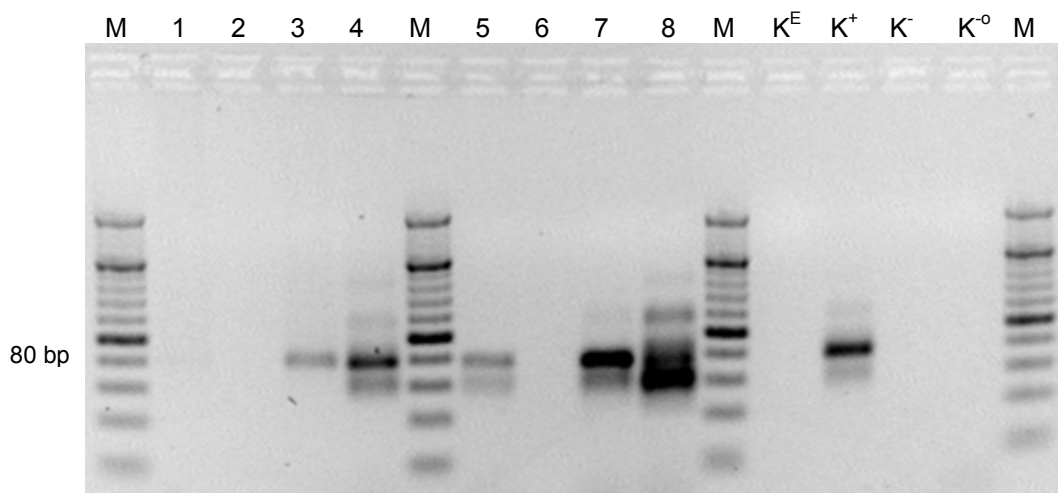


Abbildung 31: Emulsions-PCR der zweiten Selektionsrunde der DNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; 5) Gibberellinsäure, offene Kontrolle; 6) Histamin, offene Kontrolle; 7) Indol-3-essigsäure, offene Kontrolle; 8) Folsäure, offene Kontrolle; K^E) Enzymzugabe nach dem Emulsions-Mix (Bank40, 1ng); K^+) geschlossene Positivkontrolle (Bank40, 1ng); K^-) geschlossene Negativkontrolle; K^0) offene Negativkontrolle

In der gelelektrophoretischen Auswertung der Emulsions-PCR von der dritten Selektionsrunde zeigen alle Aptamer-Proben die erwartete ca. 80 bp Bande. Weiterhin ist eine zweite ca. 60 bp Bande sowohl bei Histamin- als auch bei Indol-3-essigsäure zu sehen.

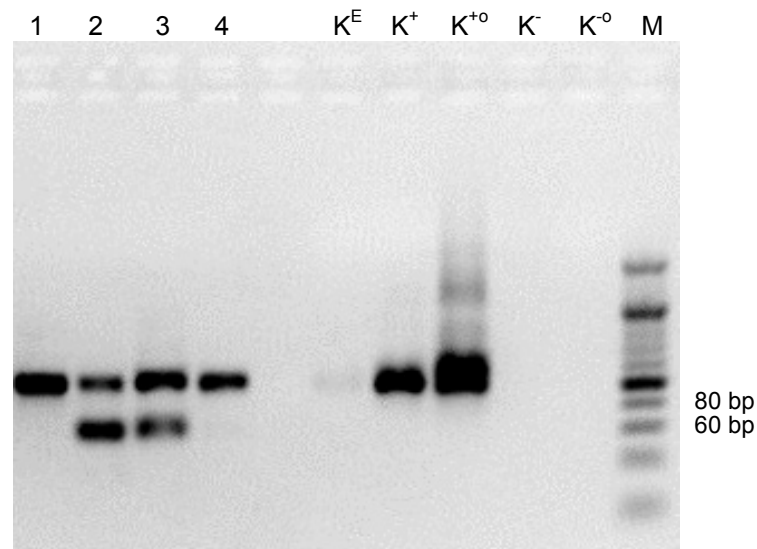


Abbildung 32: Emulsions-PCR der dritten Selektionsrunde der DNA-SELEX

M) 20bp DNA-Marker; 1) Gibberellinsäure; 2) Histamin; 3) Indol-3-essigsäure; 4) Folsäure; K^E) Enzymzugabe nach dem Emulsions-Mix (Bank40, 1ng); K^+) geschlossene Positivkontrolle (Bank40, 1ng); K^{+o}) offene Positivkontrolle (Bank40, 1ng); K^-) geschlossene Negativkontrolle; K^{-o}) offene Negativkontrolle

3.2. Diversitätsassay

Mit einem Diversitätsassay kann die Anreicherung von Nucleinsäuren in den Selektionsrunden nachgewiesen werden. Dabei können anhand der Rückschmelzkurven der Oligonukleotide Rückschlüsse auf die Diversität der Nucleinsäurebank gezogen werden.

Die erste, zweite und dritte Selektionsrunde der DNA- und RNA-SELEX wurden in der Diversitätsanalyse untersucht. Als Vergleichswert wurden die Nucleinsäurebanken verwendet, welche als initiale Nucleinsäurepoole für die erste Selektion der DNA- und RNA-SELEX dienen. Diese werden in den Graphiken als 0. Selektion bezeichnet.

Beispielhaft wird in der Abbildung 33 der Diversitätsassay der RNA-SELEX gegen Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure gezeigt. Es ist zu erkennen, dass alle Graphen, von der ersten bis zur dritten Selektionsrunde, zwei Maxima aufweisen. Das erste Maximum zeigt sich ungefähr bei der gleichen Temperatur wie das Maximum der vollständigen Nucleinsäurebank (0. Selektion). Eine Erhöhung der Schmelztemperatur ist bei der Gibberellinsäure-SELEX in der zweiten und dritten Selektionsrunde erkennbar. Wobei der Verlauf der Graphen von der Diversitätsanalyse der Histamin-SELEX dem der Gibberellinsäure-SELEX gleicht (Daten nicht gezeigt). Die Selektionsrunden der Indol-3-essigsäure weisen eine deutliche Erhöhung der Schmelztemperatur, aufsteigend von der ersten bis zu der dritten Selektion, auf. Dies ist auch bei dem Diversitätsassay der Folsäure-SELEX erkennbar (Daten nicht gezeigt).

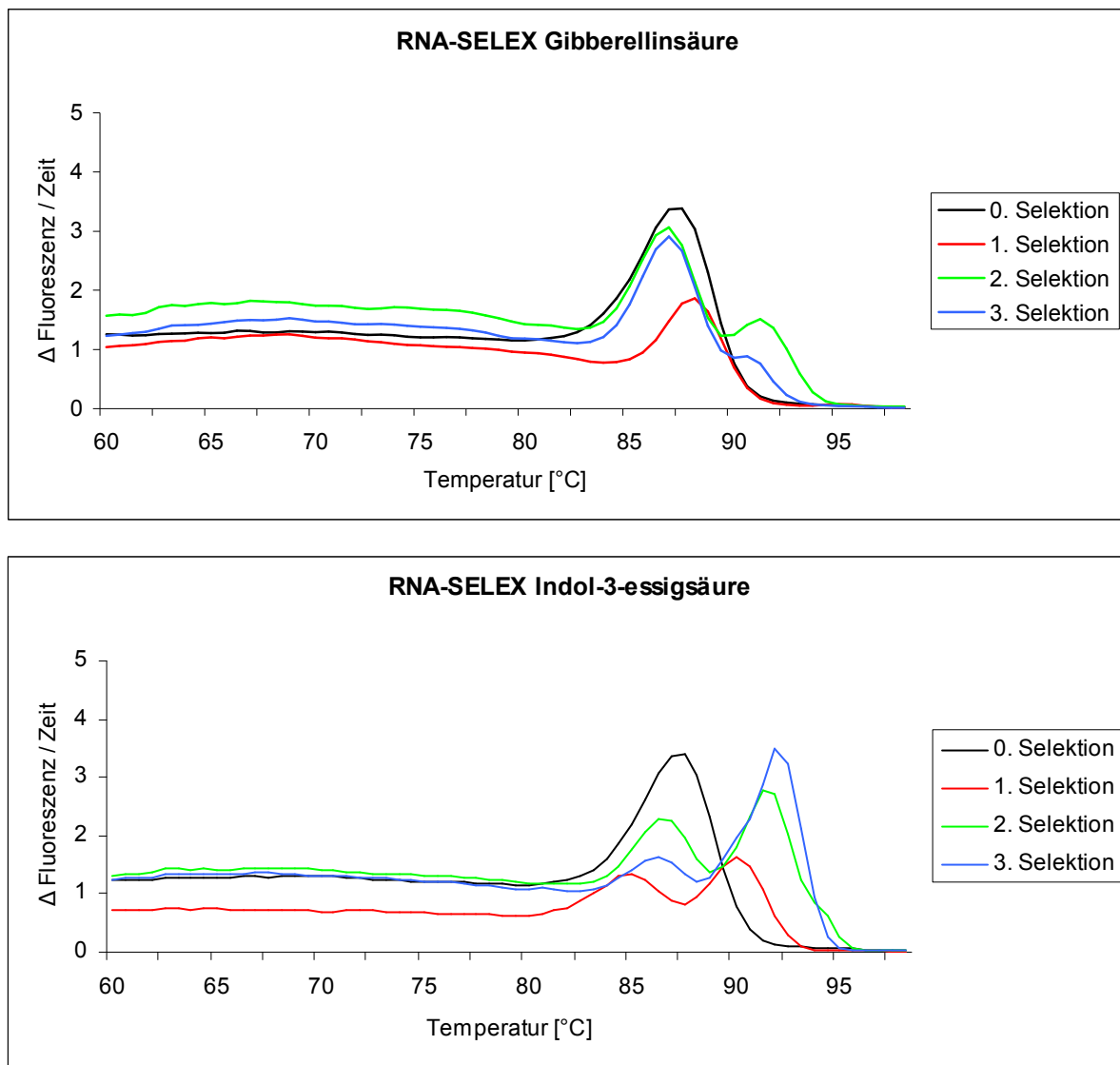


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Diversitätsanalyse der RNA-SELEX. Gezeigt ist die Fluoreszenzänderung während des Rückschmelzens der cDNA.

Die Abbildung 34 zeigt die Auswertung der Diversitätsanalyse der DNA-SELEX. Bei der DNA-SELEX gegen Gibberellinsäure ist keine Verschiebung der Kurven in Bezug zur vollständigen Nukleinsäurebank zu sehen. Das gleiche Ergebnis zeigt die Folsäure-SELEX (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigt die Abbildung 34 den Diversitätsassay der Indol-3-essigsäure-SELEX. Hier ist eine deutliche Erhöhung der Schmelztemperatur in der dritten Selektionsrunde zu erkennen. Auch dieser Graph weist zwei maximale Anstiege auf. Ähnlich stellt sich auch die Auswertung der Selektionen gegen Histamin dar (Daten nicht gezeigt).

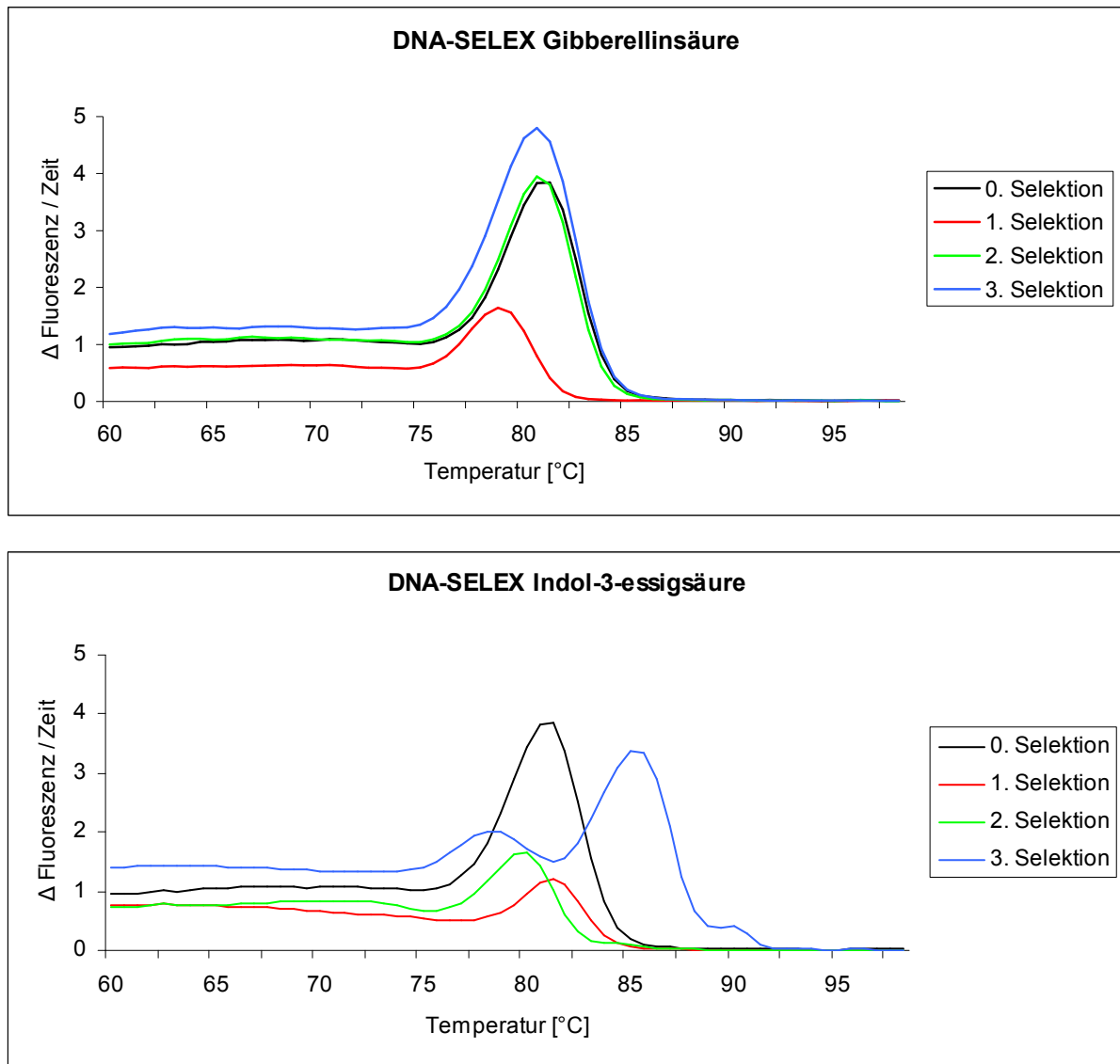


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Diversitätsanalyse der DNA-SELEX. Gezeigt ist die Fluoreszenzänderung während des Rückschmelzens der DNA.

3.3. SOLEXA-Sequenzierung

Sequenziert wurden die angereicherten Sequenzen der RNA-SELEX mit der SOLEXA-Technologie von Illumina. Die erste, zweite und dritte Selektionsrunde der RNA-SELEX wurden analysiert. Die Sequenzen wurden nach absteigender relativer Häufigkeit aufgelistet. Diese wird aus dem Quotienten der Gesamtzahl der Sequenzen einer Selektionsrunde und der absoluten Häufigkeit einer Sequenz errechnet. Es wurde nach Sequenzen gesucht, die in der zweiten und der dritten Selektionsrunde mit großer Häufigkeit vorkommen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Sequenzen einmalig für das Zielmolekül sind und nicht bei den anderen Targets vorkommen. So wurde sicher gestellt, dass die Aptamersequenz spezifisch an das Zielmolekül bindet. Basen, die von der am häufigsten vorkommenden Sequenz abweichen, sind blau markiert.

Die Tabelle 14 zeigt eine Sequenzfamilie der Gibberellinsäure-SELEX, in der sich die einzelnen Sequenzen in nur wenigen Basen voneinander unterscheiden und von der einige mit hoher relativer Häufigkeit vorkommen. Gezeigt sind einige Beispiele aus einer Sequenzfamilie, die insgesamt 29 verschiedene Sequenzen umfasst. Die oberen zwei Sequenzen sind identisch und kamen vielfach in der zweiten und dritten Selektionsrunde vor.

Tabelle 14: Auszug der Sequenzfamilie von möglichen Aptameren für Gibberellinsäure

relative Häufigkeit	Sequenz (5'→3')	Selektionsrunde
0.03613	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTCCT	2
0.03329	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTCCT	3
0.00125	GA ACTGAATAA ATGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTCCT	2
0.00047	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTC CA	3
0.00042	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTC CC	3
0.00032	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTC CC	2
0.00025	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGC AGTAATTCCT	3
0.00023	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGG CAATTCCT	2
0.00022	GA ACTGAATAACTGCTA CACTAGTGCTGCGGTAATTCCT	3
0.00021	GA ACTGAATAACTGCTAGCACTAGTGCTGCGGTAATTC CA	2

Auch in der Tabelle 15 sind Sequenzen aufgelistet, die sich nur in einer bzw. zwei Basen unterscheiden. Die erste und dritte, sowie die zweite und letzte Sequenz sind identisch. Zu erkennen ist, dass die erste Sequenz von der zweiten bis zur dritten Selektionsrunde stark angereichert wurde.

Tabelle 15: Sequenzfamilie von möglichen Aptameren für Gibberellinsäure

relative Häufigkeit	Sequenz (5'→3')	Selektionsrunde
0.00256	CACATCTACTAGCCTATACCTAGGTATGGGCCTAACCGCT	3
0.00112	CACATCTACTGGCCTATACCTAGGTATGGGTCTAACCGCT	2
0.00036	CACATCTACTAGCCTATACCTAGGTATGGGCCTAACCGCT	2
0.00035	CACATCTACTAGCCTATACCTAGGTATGGGTCTAACCGCT	2
0.00027	CACATCTACTGGCCTATACCTAGGTATGGGTCTAACCGCT	3

Die Sequenzierung der Histamin-Selektionen zeigte überwiegend Sequenzen, welche von der zweiten bis zur dritten Runde an Häufigkeit abnehmen. Allerdings sind auch Sequenzen, welche die oben genannten Kriterien erfüllen, zu finden. Die Tabelle 16 zeigt beispielhaft drei verschiedene Sequenzen, deren Häufigkeit in der dritten Runde ansteigt.

Tabelle 16: Mögliche Aptamer-Sequenzen von Histamin

relative Häufigkeit	Sequenz (5'→3')	Selektionsrunde
0.00763	GGCTTATACTATAGCCTCTTAAAAGTTCTACACGAACTAT	3
0.00194	GGCTTATACTATAGCCTCTTAAAAGTTCTACACGAACTAT	2
0.00064	GGCTTATACTATAGCCTCTTAAAAGTTCTACACGAACTAA	3
0.00296	GACACAAGGTATGCTGCTGACTAGTCAGTAGCTTTGCCTA	3
0.00156	GACACAAGGTATGCTGCTGACTAGTCAGTAGCTTTGCCTA	2
0.00242	ATTGAACACTTGTTGTTCTCTCCTTGTCCTGTGGGACGA	3
0.00226	ATTGAACACTTGTTGTTCTCTCCTTGTCCTGTGGGACGA	2

Sequenzfamilien, die mehr als drei Sequenzen umfassen, konnten bei Histamin nicht gefunden werden.

Mit Hilfe des Programms *mfold* werden mögliche Sekundärstrukturen von einzelsträngigen Nukleinsäuren errechnet. Nach dem Prinzip des kleinsten Energieaufwandes, welcher für die Bildung nötig ist, werden die Strukturen ermittelt [Zuker, 2003].

Für vier mögliche Aptamer-Sequenzen von Gibberellinsäure und Histamin wurde die Sekundärstruktur berechnet. Da diese aus einer RNA-SELEX stammen, wurden die Sequenzen als RNA in das Programm eingegeben. Die verwendeten Sequenzen wurden in den Tabellen 14 bis 16 farbig markiert.

Die in der Abbildung 35 dargestellten Strukturen weisen eine große Ähnlichkeit auf und gehören zu zwei Sequenzfamilien, die vielfach vorkommen.

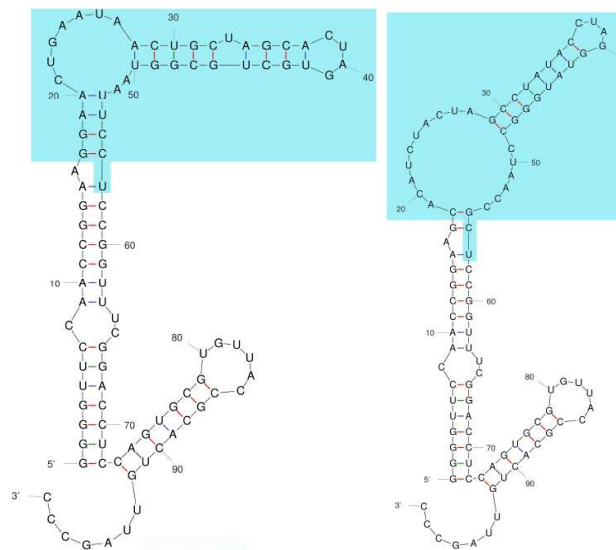


Abbildung 35 : Mögliche Sekundärstruktur der Gibberellinsäure-Aptamere. Die am häufigsten vorkommende Sequenz der Tabelle 14 (links) und der Tabelle 15 (rechts). Die Sequenz (blau umrandet) ist flankiert von den Primern.

Die Abbildung 36 zeigt die Sekundärstrukturen zweier Sequenzen aus der Histamin-SELEX. Auch diese lassen untereinander große Übereinstimmungen erkennen.

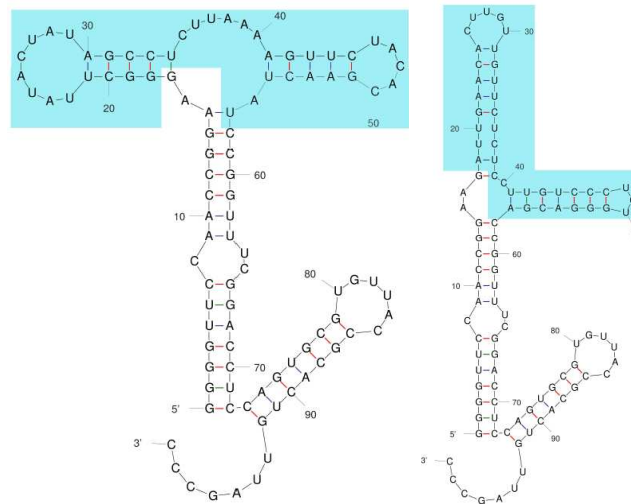


Abbildung 36 : Mögliche Sekundärstruktur der Histamin-Aptamere. Die am häufigsten vorkommende Sequenz der Tabelle 16 (links) und die Sequenz mit einer relativen Häufigkeit von 0.00242 der Tabelle 16 (rechts). Die Sequenz (blau umrandet) ist flankiert von den Primern.

Alle berechneten Sekundärstrukturen bilden Haarnadelschleifen und interne Schleifen aus. Allerdings stellen die Strukturen nur eine mögliche Konformation der Nucleinsäurefragmente dar und entsprechen nicht zwingend der tatsächlichen Sekundärstruktur.

Für Folsäure und Indol-3-essigsäure konnten keine Sequenzen identifiziert werden, die in den letzten beiden Selektionsrunden auftreten und nicht bei den anderen Zielmolekülen vorkommen. Für Folsäure konnte eine, viele Sequenzen umfassende, Sequenzfamilie gefunden werden, von denen einige mit großer Häufigkeit vorkommen. Jedoch konnten diese Sequenzen auch im Oligonucleotidpool von Indol-3-essigsäure gefunden werden. Die Sequenzen der Indol-3-essigsäure-SELEX, welche in der zweiten und dritten Selektionsrunde auftreten, kommen zum Großteil auch in dem Nucleinsäurepool von Folsäure vor.

3.4. Die Optimierung der Q-Beta Replikation

Um die Effizienz der Q-Beta Replikation zu untersuchen, wurden mehrere Parameter analysiert. Untersucht wurden die Replikationseffizienz von verschiedenen Nukleinsäurebanken, die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur. Die Nukleinsäurebank G340C3 wurde als einzelsträngige DNA verwendet. Die weiteren Bibliotheken (QBank40, QST40 und T7G340C3) wurden in RNA transkribiert. Im Folgenden wird die Gesamtmenge an RNA angegeben, welche in die Reaktion eingesetzt wurde.

Die Abbildung 37 zeigt die Replikationseffizienz der Nukleinsäurebanken QBank40, QST40, T7G340C3 und G340C3. Deutlich erkennbar ist die unerwartete ca. 100 bp Bande der offenen Negativkontrolle. Bei fast allen Q-Beta Replikationen ist diese Bande zu sehen. In der geschlossenen Negativkontrolle ist dagegen keine Bande detektierbar. Die Positivkontrolle sollte eine Bande von 136 bp zeigen. In der geschlossenen Positivkontrolle ist diese zu erkennen. In der offenen Positivkontrolle ist eine starke 100 bp Bande zu sehen.

Die Nukleinsäurebanken T7G340C3 und G340C3 zeigen keine Banden. Für diese Banken konnte auch bei dem Einsatz von 1000 ng RNA bzw. DNA keine Replikation festgestellt werden. Die QST40-Bibliothek und die QBank40-Bibliothek zeigen die erwarteten Banden in Höhe von 100 bp bzw. 136 bp. Es ist zu erkennen, dass die Banden der QST40-Bank stärker ausgebildet sind. In einem weiteren Versuch wurden 0,01 ng QST40-RNA in die Q-Beta Amplifikation eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 2 pg/ μ l. Auch hier waren die gewünschten 100 bp Banden zu sehen (Abbildung 39). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche mit der QST40-Nukleinsäurebank durchgeführt.

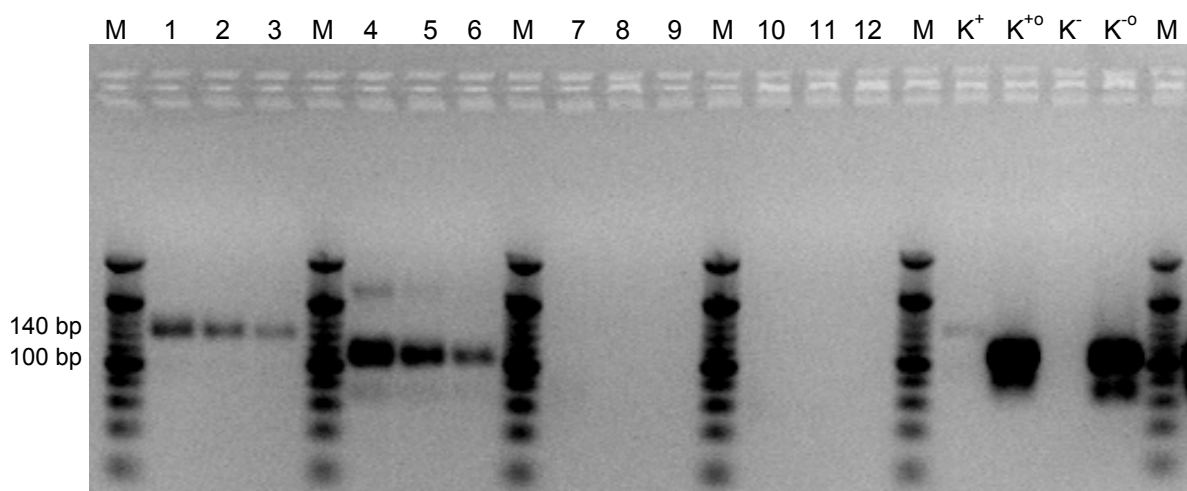


Abbildung 37: Vergleich der Q-Beta Replikationseffizienz zwischen Nukleinsäurebanken
 M) 20bp DNA-Marker; 1) QBank40, 10ng; 2) QBank40, 1ng; 3) QBank40, 0,1ng; 4) QST40, 10ng; 5) QST40, 1ng; 6) QST40, 0,1ng; 7) T7G340C3, 10ng; 8) T7G340C3, 1ng; 9) T7G340C3, 0,1ng; 11) G340C3, 10ng; 12) G340C3, 1ng; 13) G340C3, 0,1ng; K⁺) geschlossene Positivkontrolle (qb 3.888, 10ng); K^{+o}) offene Positivkontrolle (qb 3.888, 10ng); K⁻) geschlossene Negativkontrolle; K^{-o}) offene Negativkontrolle

Die Q-Beta Replikation ist mit vier Stunden Inkubationszeit sehr zeitaufwendig. Daher wurde untersucht, ob eine Verkürzung der Inkubationszeit möglich ist oder eine Erhöhung der Temperatur eine höhere Amplifikationsrate zur Folge hat.

Die Abbildung 38 zeigt den Vergleich zwischen verschiedenen Replikationszeiten und Konzentrationen der QST40-Nukleinsäurebank. Die Inkubationszeit wurde in einem Intervall von 30 Minuten beendet. In die Reaktion wurden 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng der QST40-RNA eingesetzt. In der Abbildung 38 ist zu erkennen, dass bereits nach einer Stunde die erwartete 100 bp Bande zu sehen ist. Bei den Proben, die eine Menge von 0,01 ng Template-RNA besaßen, sind nur schwache Banden detektierbar. Die 1 ng-Proben zeigen zwischen drei Stunden und 3½ Stunden Inkubationszeit nur einen schwachen Anstieg der Bandenstärke. Nach 3½ Stunden Inkubationszeit ist bei den Proben mit 1 ng und 0,01 ng Template-RNA keine deutliche Zunahme der Bandenstärke ersichtlich.

Schwach erkennbar sind ca. 60 bp und ungefähr 200 bp große Banden, welche bei den Proben mit 1 ng Template-RNA auftreten. Die geschlossene Positiv- und Negativkontrolle zeigen, wie erwartet, eine 136 bp Bande bzw. keine Bande.

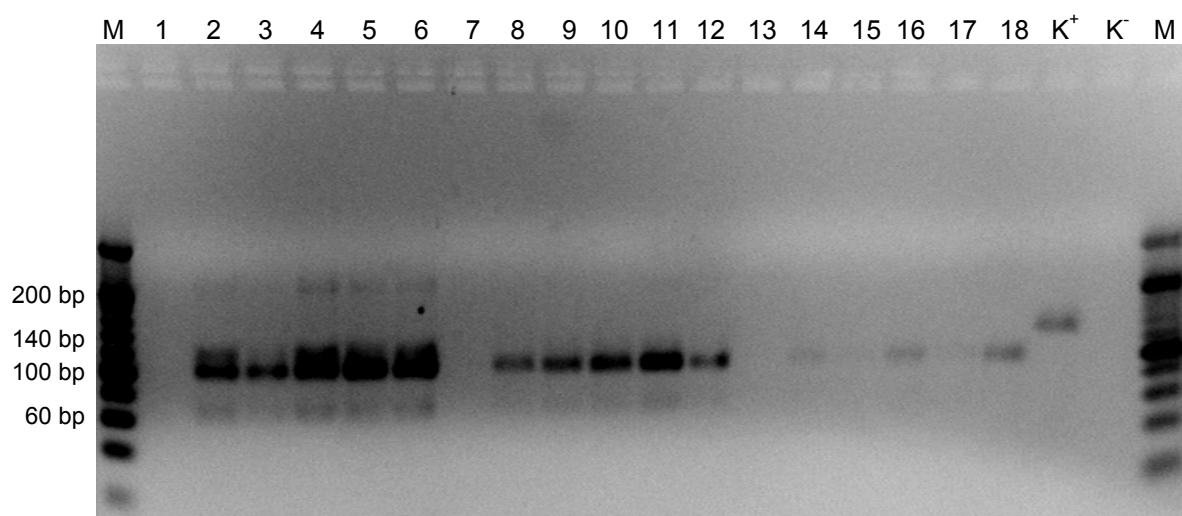


Abbildung 38: Optimierung der Inkubationszeit der Q-Beta Replikation

M) 20bp DNA-Marker; 1) 1ng, 0 Stunden; 2) 1ng, 2 Stunden; 3) 1ng, 2½ Stunden; 4) 1ng, 3 Stunden; 5) 1ng, 3½ Stunden; 6) 1ng, 4 Stunden; 7) 0,1ng, 0 Stunden; 8) 0,1ng, 2 Stunden; 9) 0,1ng, 2½ Stunden; 10) 0,1ng, 3 Stunden; 11) 0,1ng, 3½ Stunden; 12) 0,1ng, 4 Stunden; 13) 1) 0,01ng, 0 Stunden; 14) 0,01ng, 2 Stunden; 15) 0,01ng, 2½ Stunden; 16) 0,01ng, 3 Stunden; 17) 0,01ng, 3½ Stunden; 18) 0,01ng, 4 Stunden; K⁺) geschlossene Positivkontrolle (QBank40-RNA, 1ng); K⁻) geschlossenen Negativkontrolle

Die Effizienz der Amplifikation wurde zwischen den Inkubationstemperaturen 25°C, 30°C und 37°C verglichen. Die Abbildung 39 zeigt das Ergebnis des Temperaturvergleichs zwischen 25°C und 30°C. Ein Unterschied in der Stärke der 100 bp Banden ist zwischen den Temperaturen nicht zu erkennen. Weiterhin ist bei beiden Temperaturen die erste Bande nach einer Stunde zu sehen. Die Positiv- und Negativkontrollen weisen das gleiche, schon in Abbildung 36 beschriebene, Bild auf. Bei den offenen Kontrollen ist eine 100 bp Bande zu

detektieren. Eine weitere Replikation wurde bei 37°C durchgeführt. Auch hier konnte keine Erhöhung der Replikationseffizienz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

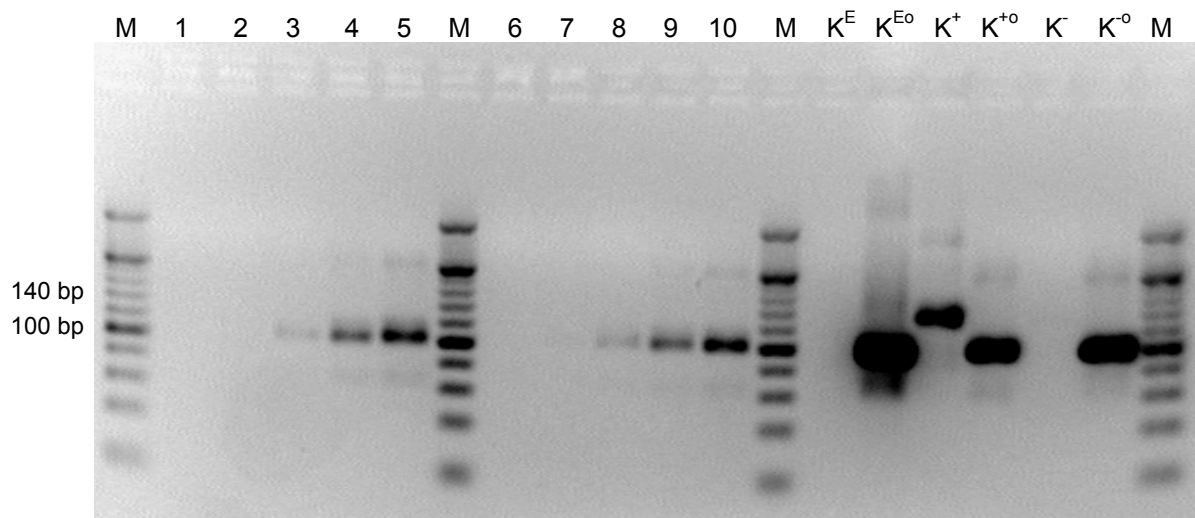


Abbildung 39: Vergleich der Inkubationstemperaturen 25°C und 30°C der Q-Beta Replikation

M) 20bp DNA-Marker; 1) 25°C, 0 Minuten; 2) 25°C, 30 Minuten; 3) 25°C, 1 Stunde; 4) 25°C, 2 Stunden; 5) 25°C, 4 Stunden; 6) 30°C, 0 Minuten; 7) 30°C, 30 Minuten; 8) 30°C, 1 Stunde; 9) 30°C, 2 Stunden; 10) 30°C, 4 Stunden; K^E) Enzymzugabe nach dem Emulsions-Mix (QST40-RNA, 1ng); K^{E0}) spätere Enzymzugabe, offene Kontrolle (QST40-RNA, 1ng); K^+) geschlossene Positivkontrolle (QBank40-RNA, 1ng); K^{+0}) offene Positivkontrolle (QBank40-RNA, 1ng); K^-) geschlossene Negativkontrolle; K^{-0}) offene Negativkontrolle

3.5. Diversitätsanalyse der Q-Beta Replikation

Um zu untersuchen, ob die Q-Beta RNA-Polymerase bestimmte Sequenzen aus einer Nukleinsäurebank bevorzugt amplifiziert, erfolgten drei aufeinander folgende Q-Beta Replikationen mit der QST40-RNA-Bibliothek. Des Weiteren wurde überprüft, ob es möglich ist, mit dem Diversitätsassay RNA zu analysieren.

Der Diversitätsassay wurde mit den RNA- und cDNA-Proben aller drei Replikationsrunden durchgeführt. Als Vergleichswert wurde die QST40-Nukleinsäurebank, welche nicht mit der Q-Beta Polymerase amplifiziert wurde, verwendet. Diese wird im Weiteren als 0. Replikation bezeichnet. Beispielhaft werden die Oligonukleotide der drei Replikationsrunden ausgewertet, die für vier Stunden in Emulsion inkubiert wurden.

Die Abbildung 40 zeigt den Diversitätsassay der RNA aus den Q-Beta Replikationen. Die Graphen des Diversitätsassays zeigen keine prägnanten Maxima. Daher kann keine Erhöhung der Schmelztemperatur festgestellt werden. Alle Auswertungen der Diversitätsanalysen, welche mit RNA durchgeführt wurden, zeigen ein ähnliches Bild (Daten nicht gezeigt).

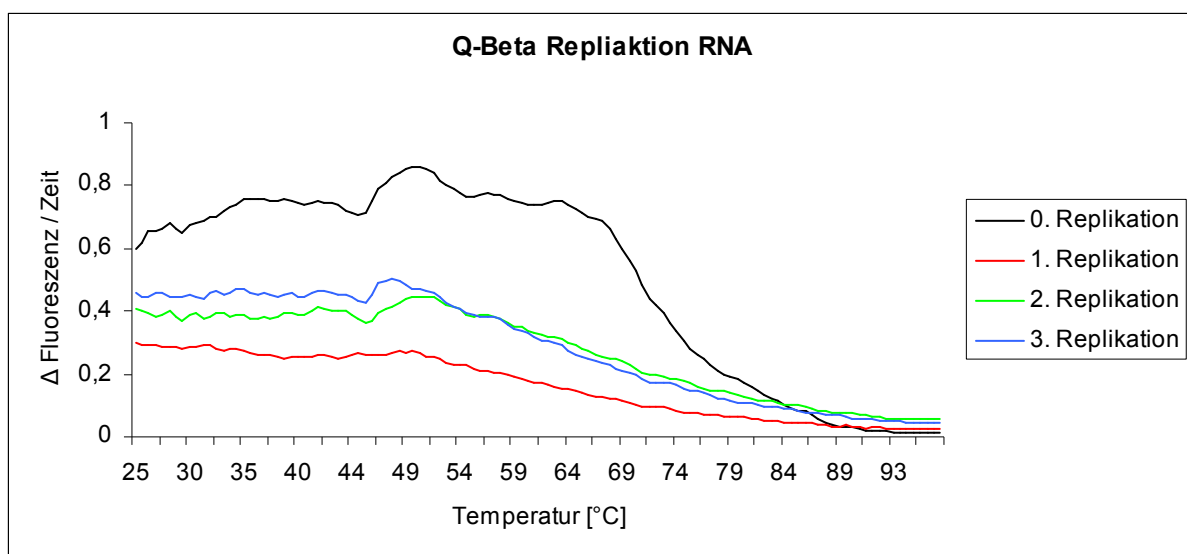


Abbildung 40: Graphische Darstellung des RNA-Diversitätsassays der Q-Beta Replikation. Gezeigt ist die Fluoreszenzänderung während des Rückschmelzens der RNA.

Der Diversitätsassay der Q-Beta Replikation, in welchem die cDNA verwendet wurde, wird in der Abbildung 41 gezeigt. Es lässt sich eine Erhöhung der Schmelztemperatur in der ersten Replikationsrunde feststellen. Weiterhin zeigt der Graph zwei Maxima. Auch in der zweiten Replikation ist eine erhöhte Schmelztemperatur zu erkennen. Allerdings ist die Kurve im Vergleich zur ersten Replikationsrunde weniger stark nach rechts verschoben. Das

Maximum liegt ungefähr auf der gleichen Höhe wie der erste maximale Anstieg der ersten Replikation.

Es wurde auch ein Diversitätsassay mit Proben durchgeführt, die vier Stunden ohne Emulsion amplifiziert wurden. Zwischen den Graphen der Replikation in Emulsion und denen der Replikation ohne Emulsion ist kein Unterschied in Bezug auf eine veränderte Schmelztemperatur ersichtlich. Auch zeigen auch die Replikationen mit einer Inkubationszeit von drei Stunden keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zur vierstündigen Replikation (Daten nicht gezeigt).

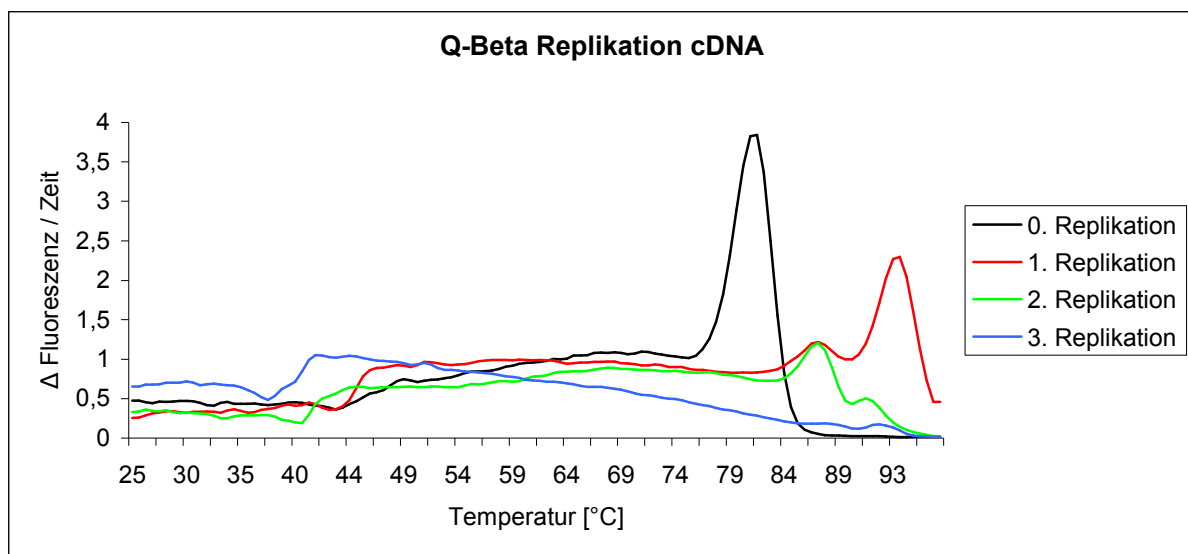


Abbildung 41: Graphische Darstellung des cDNA-Diversitätsassays der Q-Beta Replikation. Gezeigt ist die Fluoreszenzänderung während des Rückschmelzens der cDNA.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, RNA- und DNA-Aptamere gegen Folsäure, Histamin, Gibberellinsäure und Indol-3-essigsäure zu selektieren und das Verfahren zu optimieren. Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren, welche durch das SELEX-Verfahren aus einer Nukleinsäurebank isoliert werden. SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) ist ein sich wiederholender Prozess, in dem in mehreren Selektionsschritten Aptamere gegen Zielmoleküle selektiert werden. Durch das Wiederholen von der Inkubation mit dem Zielmolekül, Verwerfen der nicht-bindenden Sequenzen und Amplifikation der Nukleinsäurefragmente, welche an das Target binden, können hochaffine und sehr spezifische Aptamere für das Zielmolekül angereichert werden.

4.1. SELEX

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bereits nach drei Selektionsrunden Aptamere gegen die genannten Zielmoleküle angereichert werden können. Nach Glökler *et al.* [2010] werden für eine DNA- und RNA-SELEX 10 bis 15 Selektionsrunden benötigt, um Aptamere zu selektieren. Demnach nehmen eine RNA-SELEX 20 bis 45 Tage und eine DNA-SELEX 10 bis 20 Tage in Anspruch. Weiterhin werden zwei Tage für das Klonieren der angereicherten Nukleinsäurefragmente in Bakterien benötigt, um die Oligonukleotide sequenzieren zu können. In dieser Arbeit erfolgten nur drei Selektionsrunden, wobei eine Selektionsrunde, mit anschließender Amplifikation, an einem Tag durchgeführt werden konnte. Die vorbereitende PCR für die verwendete SOLEXA-Sequenzierung konnte innerhalb eines Tages erfolgen. Somit kann der Zeitaufwand einer SELEX von 10 bis 45 auf vier Tage verkürzt werden.

4.1.1. RNA-SELEX

Nach der Selektion gegen das Zielmolekül werden die RNA-Aptamere üblicherweise für die Amplifikation in cDNA transkribiert. Dann erfolgt die Transkription in RNA für die nächste Selektionsrunde. Dies ist sehr arbeits- und zeitaufwendig. Des Weiteren können in jedem enzymatischen Schritt Fehler in die Sequenzen eingebaut werden. In dieser Arbeit wurden die RNA-Aptamere mit der Q-Beta Replikase amplifiziert. Die Oligonukleotide mussten nicht in cDNA transkribiert werden, wodurch die zwei enzymatischen Schritte der Transkription wegfielen.

Obwohl in der gelelektrophoretischen Auswertung der ersten und zweiten Selektionen teilweise nur schwache Banden oder keine Banden detektierbar waren (Abbildung 25 und 27), konnten in der Amplifikation der dritten Selektionsrunde bei allen Proben die

gewünschten ca. 100 bp große Nukleinsäuren nachgewiesen werden (Abbildung 28). Möglicherweise war das Proben-Volumen, welches für die Gelelektrophorese verwendet wurde, zu gering und die RNA-Menge lag somit unter dem Detektionslimit.

Die Abbildungen der gelelektrophoretischen Auswertung der Selektionsrunden (siehe Abschnitt 3.1.1.), zeigen oft zusätzliche Banden. Diese können Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren darstellen.

Die vierte Selektionsrunde diente als Bindungskontrolle. Die selektierten Aptamere wurden mit einem anderen Zielmolekül inkubiert. Wären die angereicherten Nukleinsäurefragmente spezifisch für ihr Zielmolekül, sollten bei der Bindungskontrolle keine Banden in der Agarose-Gelelektrophorese zu sehen sein (Abbildung 29). Allerdings sind bei allen Kontrollen Banden zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass anscheinend nicht alle in einer Probe enthaltenen Oligonukleotide spezifisch für ihr Zielmolekül waren. Bei den Gibberellinsäure-Aptameren und den Indol-3-essigsäure-Aptameren sind die Banden der Bindungskontrollen stärker ausgeprägt als die Proben, die mit ihrem eigentlichen Zielmolekül inkubiert wurden. Vermutlich sind in den Nukleinsäurepools Sequenzen enthalten, die auch andere Targets mit hoher Affinität binden.

4.1.2. DNA-SELEX

Die DNA-SELEX wurde halbautomatisch durchgeführt. Für Selektionen und Aufreinigungen wurde der Magnetpartikelprozessor „KingFisher Flex“ von Thermo Scientific verwendet. Aufgrund der Automatisierung ist die SELEX besser reproduzierbar, weniger zeit- und arbeitsaufwendig.

Die Auswertungen der Selektionsrunden zeigten oft nur geringe Mengen an DNA (Abschnitt 3.1.2.). Aptamere binden kleine Moleküle, indem sie die Moleküle in ihre Struktur integrieren (Abbildung 11). Möglicherweise bildete die DNA keine ausreichenden Sekundärstrukturen aus, um die kleinen Zielmoleküle zu binden. Ferner könnte die Amplifikation nicht ausreichend effizient gewesen sein. Auch die Parameter der Selektionen könnten nicht optimal gewesen sein. Eine effizientere Amplifikation und veränderte Konditionen der Selektion könnten vermutlich bessere Ergebnisse zeigen.

Die Zielmoleküle wurden auf magnetischen Partikeln immobilisiert. Vermutlich wurden sie in einer zu hohen Dichte an die Partikel gebunden, sodass die Nukleinsäurefragmente sterisch an der Bindung der Liganden gehindert wurden. Ein Hinweis, dass Folsäure in einer sehr hohen Dichte immobilisiert wurde, könnte das Vorhandensein von Folsäure nach der Elution in den Proben sein (Abbildung 26). Weiterhin könnten aufgrund der Immobilisierung mögliche Bindungsstellen des Zielmoleküls für die Oligonukleotide verloren gehen.

4.2. Diversitätsassay der SELEX

Der Diversitätsassay ist ein schneller und einfacher Nachweis, ob die SELEX mit den verwendeten Parametern erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Eine Diversitätsanalyse kann Aufschluss darüber geben, ob in den Selektionsrunden Nukleinsäuren angereichert wurden. Anhand der Rückschmelzkurven der Oligonukleotide lässt sich eine Abnahme der Diversität beobachten. Besitzt eine Probe eine hohe Komplexität, bilden die Nukleinsäurestränge Heteroduplexe aus. Diese besitzen eine geringere Schmelztemperatur als Nukleinsäuren, welche komplementär zueinander sind. Verringert sich die Diversität, steigt somit die Schmelztemperatur [Schütze *et al.*, 2010].

Der Diversitätsassay der RNA-SELEX zeigt bei allen Zielmolekülen eine Erhöhung der Schmelztemperatur (Abbildung 33). Ein Anstieg der Schmelztemperatur ist ab der zweiten Selektionsrunde bei der Gibberellinsäure- und Histamin-SELEX zu sehen. Die Indol-3-essigsäure- und Folsäure-SELEX zeigen bereits ab der ersten Selektionsrunde erhöhte Werte. Somit erfolgte die Anreicherung von Oligonukleotiden früher als bei Histamin und Gibberellinsäure. Die Graphen der Abbildung 33 besitzen bei fast allen Proben zwei Maxima. Besonders deutlich ist dies bei den Selektionsrunden der Indol-3-essigsäure zu erkennen. Das erste Maximum liegt häufig auf der gleichen Höhe wie das Maximum der initialen Nukleinsäurebank (0. Selektionsrunde). Dies lässt erkennen, dass in den Proben viele unterschiedliche Nukleinsäuresequenzen enthalten waren. Diese bildeten Heteroduplexe aus und besitzen somit eine ähnliche Schmelztemperatur wie die 0. Selektionsrunde.

Zusammenfassend deutet der Diversitätsassay der RNA-SELEX aufgrund der Abnahme der Komplexität darauf hin, dass mögliche Aptamere angereichert wurden.

Bei dem Diversitätsassay der DNA-SELEX gegen Indol-3-essigsäure und Histamin konnte eine Erhöhung der Schmelztemperatur in der dritten Selektionsrunde festgestellt werden (Abbildung 34). Anscheinend konnten Nukleinsäurefragmente, die an Indol-3-essigsäure und Histamin binden, erst in der dritten Selektionsrunde angereichert werden. Möglicherweise binden an diese Zielmoleküle nur wenige DNA-Sequenzen aus dem Nukleinsäurepool. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auswertung. Histamin zeigte im Vergleich zu den anderen Zielmolekülen immer eine schwächere Bande (siehe Abschnitt 3.1.2.). In der Diversitätsanalyse von Gibberellinsäure und Folsäure zeigt sich keine Verschiebung der Graphen und folglich keine erhöhte Schmelztemperatur. Demnach hat die Diversität der Nukleinsäurebank nicht abgenommen. Scheinbar konnten in den Selektionsrunden keine Aptamere angereichert werden.

4.3. Die Sequenzierung

Durch das SOLEXA-Verfahren wurden die Nukleinsäurefragmente der RNA-SELEX nach drei Selektionsrunden sequenziert. Da das Klonieren der angereicherten Oligonukleotide in Vektoren nicht erforderlich war, ist die angewendete Vorgehensweise weniger arbeits- und zeitaufwendig. Die Sequenzen der ersten Selektionsrunde wurden nicht für die Auswertung verwendet, da Fehler in der Sequenzierung aufgetreten sind (Daten nicht gezeigt).

Um Aptamere zu finden, die spezifisch und mit einer hohen Affinität an das Zielmolekül binden, wurden die Sequenzen nach mehreren Kriterien analysiert.

Es wurde nach Sequenzen gesucht, die nur in dem Sequenzpool des Zielmoleküls vorkommen und nicht bei den anderen Zielmolekülen zu finden sind. Die Sequenzen wurden nach der relativen Häufigkeit, mit der sie in dem Sequenzpool vorliegen, sortiert. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die relative Häufigkeit von der zweiten bis zur dritten Selektionsrunde ansteigt. Sequenzen, die spezifisch für ihr Zielmolekül sind und mit einer hohen relativen Häufigkeit vorkommen, könnten Aptamere darstellen.

In dem sequenzierten Nukleinsäurepool der Gibberellinsäure-SELEX wurden zwei Sequenzfamilien gefunden (Tabelle 14 und 15). Wobei homologe Sequenzen, die vielfach vorkommen, wahrscheinlich ein Bindungsmotiv für das Zielmolekül besitzen. Die Sequenzen unterscheiden sich untereinander in nur wenigen Basen. Diese Abweichungen könnten durch falsch eingebaute Nukleotide in der Q-Beta Amplifikation zu erklären sein, da die RNA-Polymerase keine Korrekturlese-Funktion besitzt.

Auch in der Sequenzierung der Histamin-Selektionsrunden konnten Sequenzen gefunden werden, welche die genannten Anforderungen erfüllen (Tabelle 16). In dem Nukleinsäurepool der Histamin-SELEX sind viele weitere Sequenzen enthalten, die spezifisch für Histamin sind und in der zweiten und dritten Selektionsrunde vorkommen. Allerdings nimmt die relative Häufigkeit von der zweiten bis zur dritten Selektion ab. Möglicherweise war die Bindungsaffinität der Oligonukleotide zu Histamin nicht ausreichend hoch. Dadurch wurden sie vermutlich, durch die erhöhte Stringenz der dritten Selektionsrunde, während der Waschschriffe von Histamin abgelöst.

Für Gibberellinsäure und Histamin wurden für vier Sequenzen die möglichen Sekundärstrukturen mit dem Programm *mfold* berechnet (Abbildung 35 und 36). Von den zwei Sequenzfamilien der Gibberellinsäure-SELEX wurde die jeweils häufigste Sequenz analysiert. Diese zeigen eine auffällig ähnliche Struktur (Abbildung 35). Ebenso wurden von Histamin die Sequenz mit der höchsten relativen Häufigkeit und eine weitere Sequenz untersucht. Die Sekundärstrukturen der beiden Sequenzen zeigen ebenfalls große Übereinstimmungen. Alle Sequenzen bilden Haarnadelschleifen und interne Schleifen aus. In Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass Aptamere kleine Moleküle in ihre Struktur

aufnehmen (Abbildung 11). Möglicherweise binden die Nukleinsäurefragmente die Moleküle durch die Haarnadelstrukturen.

Die untersuchten Sequenzen besitzen eine hohe relative Häufigkeit. Sie zeigen eine ähnliche Sekundärstruktur und kommen nicht in dem Nukleinsäurepool eines anderen Zielmoleküls vor. Diese Eigenschaften belegen die Annahme, dass sie Aptamere von Gibberellinsäure bzw. Histamin sein könnten.

In dem Nukleinsäurepool von Folsäure und Indol-3-essigsäure befinden sich große Sequenzfamilien. Die Abnahme der Komplexität konnte zwar im Diversitätsassay gezeigt werden, jedoch sind die Sequenzen nicht spezifisch (Abbildung 33). Die Sequenzen der Folsäure- und der Indol-3-essigsäure-Selektionen kommen auch in dem Sequenzpool des jeweils anderen Moleküls vor. Dies bestätigt das Ergebnis der Bindungskontrolle (Abbildung 29). In dieser wurden die Indol-3-essigsäure-Aptamere mit Folsäure inkubiert. Die Nukleinsäurefragmente aus den Indol-3-essigsäure-Selektionen, welche mit ihrem Zielmolekül inkubiert wurden, zeigen eine schwächere Bande als die Bindungskontrolle. Die Nukleinsäurefragmente der Indol-3-essigsäure binden anscheinend auch an Folsäure. Möglicherweise sind für die Aptamerbindung der beiden Zielmoleküle die gleichen Strukturmerkmale verantwortlich. Somit binden die Folsäure-Aptamere auch Indol-3-essigsäure und umgekehrt.

Um zu verhindern, dass die Aptamere unspezifisch binden, könnten Negativ-Selektionen durchgeführt werden. Zum Beispiel könnte ein Molekül, das dem Zielmolekül chemisch sehr ähnlich ist, an magnetische Partikel gebunden werden. Die angereicherten Nukleinsäurefragmente werden mit dem anderen Molekül inkubiert. Daraufhin werden die Partikel, mit dem Molekül und den gebundenen Oligonukleotiden, separiert und der Überstand wird abgenommen. In diesem Überstand sollten sich dann Aptamere befinden, welche spezifisch an ihr Zielmolekül binden.

4.4. Die Q-Beta Optimierung

Die Q-Beta Replikase ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Replikation erfolgt unabhängig von einem Promoter oder Primer. Das Enzym zeigt eine ungewöhnliche Template-Spezifität und die genauen Vorgänge der Template-Erkennung werden noch untersucht. Es konnte bereits ein Initiationssignal der Replikation gefunden werden. Von der Q-Beta Replikase amplifizierte RNAs besitzen oft eine 3' terminale Oligo(C)-Gruppe und eine 5' terminale Oligo(G)-Gruppe. Außerdem scheinen für eine effiziente Replikation bestimmte Sekundärstrukturen verantwortlich zu sein [Ugarov *et al.*, 2003]. Ugarov *et al.* [2008] untersuchten die Q-Beta Replikationseffizienz von Nucleinsäuren. Dabei konnten sie zeigen, dass bestimmte Sequenzen an den Enden eines Nucleinsäurefragments, Sekundärstrukturen ausbilden und zu einer Zirkularisierung führten. Das untersuchte Oligonucleotid wurde sehr effizient kopiert. Diese Sequenzen dienten als Primer der QST40-Nucleinsäurebank (Abbildung 14), damit die RNA mit einer hohen Effizienz amplifiziert wird.

Alle Amplifikationen in dieser Arbeit wurden in Emulsion durchgeführt. Durch das Hinzufügen von Emulsion zum Reaktionsansatz werden Mizellen gebildet, in denen die Amplifikation stattfindet. Es befinden sich nur wenige unterschiedliche Nucleinsäuren in einer Mizelle. Durch die abgegrenzte Amplifikation kann die Bildung von chimären Molekülen, sowie die Amplifikation von parasitischen Sequenzen, reduziert werden. Weiterhin werden auch Nucleinsäuren in ausreichender Menge amplifiziert, welche eine geringe Replikationseffizienz zeigen [Nakano *et al.*, 2003; Urabe *et al.*, 2010]. Allerdings ist die Endkonzentration der in Emulsion amplifizierten Nucleinsäuren geringer als bei der Vervielfältigung ohne Emulsion.

Die Kontrollen der Amplifikationen zeigen, dass durch die Verwendung von Emulsion Kontaminationen reduziert werden können. Die Abbildung 39 zeigt in der Kontrolle, in der die Q-Beta Replikase erst nach dem Emulsions-Mix dazugegeben wurde, keine Bande. Dies lässt darauf schließen, dass die Mizellen der Emulsion stabil waren. Als Positivkontrolle wurde die QBank40-Bibliothek genutzt, diese sollte eine Bande bei ca. 136 bp aufweisen. In der geschlossenen Positivkontrolle ist diese deutlich erkennbar. In der offenen Positivkontrolle ist eine 100 bp Bande detektierbar. In der geschlossenen Negativkontrolle kann keine Bande erkannt werden, die offene Negativkontrolle zeigt wiederum eine 100 bp Bande. Wahrscheinlich erfolgte die Kontamination der Reaktion durch RNA aus der Luft. Diese scheint eine hohe Replikationseffizienz zu besitzen, da die Nucleinsäuren der QBank40 entweder unter dem Detektionsminimum der Gelelektrophorese lagen oder nicht amplifiziert wurden. Durch die Emulsion wird die Amplifikation der parasitischen Sequenzen so stark reduziert, dass sie in der Gelelektrophorese nicht nachweisbar sind. Dies zeigt die

geschlossene Positivkontrolle der Abbildung 39. Da in den offenen Kontrollen eine 100 bp Bande zu sehen ist, besteht die Kontamination wahrscheinlich aus Oligonukleotiden der QST40-Bibliothek. Anscheinend sind einige dieser RNA-Fragmente ausreichend stabil in der Laborumgebung und werden mit sehr hoher Effizienz repliziert.

Die Replikationseffizienz von Nucleinsäuren in der Q-Beta Amplifikation wurde verglichen. Alle Bibliotheken besitzen die 3' Oligo(C)- und die 5' Oligo(G)-Gruppe zur Initiation der Replikation und eine 40 Nucleotide umfassende randomisierte Region. Die QST40-Nucleinsäurefragmente sind zusätzlich in der Lage, eine Zirkularität auszubilden, aufgrund der konstanten Primersequenzen. Die randomisierte Region der T7G340C3-Bibliothek wird nur flankiert von der Oligo(C)- bzw. Oligo(G)-Gruppe. Gleiches gilt für die Nucleinsäurebank G340C3, nur wurde diese als einzelsträngige DNA verwendet.

Die Nucleinsäurebanken T7G340C3 und G340C3 wurden von der Q-Beta Replikase nicht amplifiziert (Abschnitt 3.4.). Anscheinend sind die Oligogruppen an den Enden der Nucleinsäuren als Initiationssignal nicht ausreichend für eine effiziente Replikation.

Die höchste Replikationseffizienz zeigt die QST40-Bibliothek (Abbildung 37). Die Primer dieser Nucleinsäurebank sind einer RNA nachempfunden, welche hoch replikativ ist. Vermutlich bilden die Oligonukleotide, aufgrund dieser konstanten Sequenzen, eine zirkuläre Sekundärstruktur aus. Diese scheint, zusammen mit den terminalen Oligogruppen, für eine hoch effektive Replikation verantwortlich zu sein.

Zur Optimierung der vierstündigen Q-Beta Amplifikation, wurde versucht die Inkubationszeit zu verkürzen. Dafür wurde zum einem die Inkubationszeit in Intervallen verringert und zum anderen die Inkubationstemperatur erhöht. Es zeigte sich, dass im Vergleich zwischen 3½ Stunden und vier Stunden Inkubationszeit keine deutliche Zunahme der RNA-Menge festzustellen war (Abbildung 38). Auch zwischen drei Stunden und 3½ Stunden lässt sich nur ein geringer Anstieg der Bandenstärke feststellen. Wahrscheinlich genügt eine Inkubationszeit von drei Stunden, um die Template-RNA in ausreichender Menge zu replizieren.

Auffällig ist, dass zusätzlich zu der erwarteten 100 bp Bande, weitere Banden auftreten (Abbildung 38). Diese Banden konnten schon in der RNA-SELEX (Abschnitt 3.1.1.) beobachtet werden und könnten Sekundärstrukturen sein.

Der Vergleich der Replikationseffizienz zwischen den Temperaturen 25°C, 30°C und 37°C zeigte, dass eine Erhöhung der Inkubationstemperatur zu keiner gesteigerten Replikation führt (Abbildung 49). Somit kann durch ein Anheben der Temperatur die Inkubationszeit nicht verkürzt werden.

4.5. Diversitätsassay der Q-Beta Replikation

Die Q-Beta RNA-Polymerase amplifiziert bestimmte Nukleinsäuresequenzen bevorzugt und mit hoher Effizienz. Die Annahme ist, dass von einer Nukleinsäurebank einige Sequenzen effektiver kopiert werden. Daher könnten bei der Selektion von Aptameren Nukleinsäurefragmente angereichert werden, welche nicht an das Zielmolekül binden.

In drei aufeinander folgenden Replikationsrunden wurde die QST40-Bibliothek amplifiziert. Von diesen Replikationsrunden wurde ein Diversitätsassay mit der RNA, sowie mit den in cDNA transkribierten Proben durchgeführt. Der Diversitätsassay wird üblicherweise mit DNA durchgeführt, hier wurde untersucht, ob das Verfahren auf RNA übertragbar ist.

Von den Ergebnissen der RNA-Diversitätsanalyse ist keine Auswertung möglich, da aus den Graphen auf keine Erhöhung der Schmelztemperatur geschlossen werden kann (Abbildung 40). Somit können keine Rückschlüsse auf die Komplexität der Proben gezogen werden. Die Q-Beta Replikase amplifiziert keine doppelsträngigen Strukturen. Des Weiteren wurde die DNA-Bibliothek mit der T7-Polymerase transkribiert. Diese ist abhängig von ihrem Promoter und amplifiziert nur einen Strang, sodass dieser im Überschuss vorhanden ist. Wahrscheinlich kommt es bei dem Diversitätsassay nur zum Aufschmelzen von Strukturen. Somit ist es nicht möglich, die Diversitätsanalyse mit RNA durchzuführen.

Für den Diversitätsassay wurde die RNA in cDNA transkribiert. Würden alle Nukleinsäurefragmente mit der gleicher Effizienz repliziert werden, würde sich die Komplexität der Bibliothek nicht verändern. Wie erwartet, nimmt die Diversität der Nukleinsäurebank ab (Abbildung 41). Bereits in der ersten Replikationsrunde zeigt sich eine Erhöhung der Schmelztemperatur. Anscheinend werden einige Oligonukleotide bevorzugt repliziert. Die konstanten Sequenzen sind wahrscheinlich nicht ausreichend, um eine effiziente Replikation von jedem Nukleinsäurefragment sicher zu stellen. Möglicherweise tragen weitere Strukturelemente der Oligonukleotide zu einer hohen Replikationsrate bei.

Die Amplifikation wurde mit einer Inkubationszeit von drei und vier Stunden, sowie mit und ohne Emulsions-Mix durchgeführt. Zwischen den Inkubationszeiten konnten jedoch keine Unterschiede in den Diversitätsanalysen festgestellt werden. Offensichtlich kann durch eine verkürzte Inkubationszeit die Anreicherung von Sequenzen nicht reduziert werden. Weiterhin wurde bei den in Emulsion amplifizierten Proben und den offen replizierten Proben eine in etwa gleiche Erhöhung der Schmelztemperatur festgestellt. Dies zeigt, dass auch bei einer Amplifikation in Emulsion bestimmte Nukleinsäurefragment bevorzugt repliziert werden. Daher ist bei einer SELEX, in der die Aptamere mit der Q-Beta Replikase amplifiziert werden, nicht auszuschließen, dass selektierte Aptamere nicht ausreichend effizient repliziert werden.

4.6. Ausblick

In der Sequenzierung der RNA-SELEX konnten Sequenzen gefunden werden, welche Aptamere von Gibberellinsäure und Histamin sein könnten. Diese Sequenzen können synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften zum Zielmolekül untersucht werden. Durch Verkürzungsstudien könnten die Bindungsmotive innerhalb der Sequenzen analysiert werden. Bestätigen diese Untersuchungen, dass die Nukleinsäuresequenzen Aptamere sind, könnten sie in unterschiedlichen Bereichen angewendet werden. Ein Aptamer für Gibberellinsäure könnte in die 5'UTR einer mRNA integriert und als künstliches *Riboswitch* genutzt werden. Die Genregulation könnte zum Beispiel in *Escherichia coli* untersucht werden. So könnte auch die Genexpression von Gibberellinsäure in der Pflanze reguliert werden. Des Weiteren könnte ein Aptamer in der Affinitätschromatographie Anwendung finden.

Ein Histamin-Aptamer könnte verwendet werden, um die Histaminkonzentration von Nahrungsmitteln zu messen. Für Menschen mit einer Histaminintoleranz könnte so die Histamin-arme Ernährung erleichtert werden.

Der Diversitätsassay der Q-Beta Replikationen zeigte eine Abnahme der Komplexität der Nukleinsäurebank. Der genaue Mechanismus der Template-Erkennung der Q-Beta RNA-Polymerase ist nicht vollständig aufgeklärt. Die Replikationsrunden der Q-Beta Amplifikation könnten sequenziert und die Sekundärstrukturen der am häufigsten vorkommenden Sequenzen könnten analysiert werden. Möglicherweise könnten so weitere Strukturmerkmale, welche zu einer hohen Replikationsrate beitragen, identifiziert werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Banerjee, A.; Rensing, U.; August, J. *Replication of RNA viruses: X. Replication of a natural 6s RNA by the Q β RNA polymerase*. Journal of Molecular Biology. 1969, 45: 181-193.
2. Behrends, J.; Bischofberger, J.; Deutzmann, R.; Ehmke, H.; Frings, S.; Grissmer, S.; Hoth, M.; Kurtz, A.; Leipziger, J.; Müller, F.; Pedain, C.; Rettig, J.; Wagner, C.; Wischmeyer, E. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2010.
3. Biebricher, C. K.; Eicen, M.; Live, R. *Product Analysis of RNA Generated de nova by Q β Replicase*. Journal of Molecular Biology. 1981, 148: 369-390.
4. Blumenthal, T.; Carmichael, G. *RNA replication: function and structure of Q β -replicase*. Annual Review of Biochemistry. 1979, 48: 525-548.
5. Bocobza, S.; Adato, A.; Mandel, T.; Shapira, M.; Nudler, E.; Aharoni, A. *Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom*. Genes & Development. 2007, 21: 2874–2879.
6. Brown, D.; Gold, L.; *RNA replication by Q β replicase: A working model*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996, 93:11558-11562.
7. Cox, J.; Rudolph, R.; Ellington, A. *Automated RNA Selection*. Biotechnology Progress. 1998, 14: 845-850.
8. Croft, M.; Moulin, M.; Webb, M.; Smith, A. *Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches*. The National Academy of Sciences of the USA. 2007, 104: 20770-20775.
9. Diehl, F.; Li, M.; He, Y.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Dressman D. *BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions*. Nature Methods. 2006, 3: 551-559.
10. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature.1990, 346:818-822.
11. Famulok, M. *Molecular Recognition of Amino Acids by RNA- Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder*. American Chemical Society. 1994, 116: 1698-1706.
12. Famulok, M. *Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules*. Current Opinion in Structural Biology. 1999, 9: 324-329.
13. Famulok, M.; Hartig, J.; Mayer, G. *Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy*. Chemical Reviews. 2007, 107: 3715-3743.
14. Famulok, M.; Mayer, G.; Blind, M. *Nucleic Acid Aptamers-From Selection in Vitro to Applications in Vivo*. Accounts of Chemical Research. 2000, 33: 591-599.
15. Fan, M.; McBurnett, S.; Andrews, C.; Allman, A.; Bruno, J.; Kiel, J. *Aptamer Selection Express: A Novel Method for Rapid Single-Step Selection and Sensing of Aptamers*. Journal of Biomolecular Techniques. 2008, 19: 311–321.
16. Fang, X.; Tan, W. *Aptamers Generated from Cell-SELEX for Molecular Medicine: A Chemical Biology Approach*. Accounts of chemical research. 2010, 43: 48-57.

17. Glökler, J.; Schütze, T.; Konthur, Z. *Automation in the High-throughput Selection of Random Combinatorial Libraries-Different Approaches for Select Applications*. *Molecules*. 2010, 15: 2478-2490.
18. Gopinath, S. *Methods developed for SELEX*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, 387: 171-182.
19. Grabarek, Z.; Gergely J. *Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters*. *Analytical Biochemistry*. 1990, 185:131-135.
20. Grabko, V.; Chistyakova, L.; Lyapustin, V.; Korobko, V.; Miroshnikov, A. *Reverse Transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by Taq DNA polymerase*. *Federation of European Biochemical Societies*. 1996, 387: 189-192.
21. Hall, B.; Micheletti, J.; Satya, P.; Ogle, K.; Pollard, J.; Ellington, A. *Design, Synthesis, and Amplification of DNA Pools for In Vitro Selection*. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. 2009, 9.2.1-9.2.28.
22. Haruna, I.; Spiegelman, S. *Specific template requirements of RNA replicases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965, 54: 579-587.
23. Holeman, L.; Robinson, S.; Szostak, J.; Wilson, C. *Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers*. *Folding and Design*. 1998, 3: 423-431.
24. Hosoda, K.; Matsuura, T.; Kita, H.; Ichihashi, N.; Tsukada, K.; Yomo, T. *Kinetic analysis of the entire RNA amplification process by Q β replicase*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282: 15516-15527.
25. Hou, S.; Zhu, J.; Ding, M.; Lv, G. *Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. *Talanta*. 2008, 76: 798-802.
26. Huang, J.; Brieba, L.; Sousa, R. *Misincorporation by wild-type and mutant T7 RNA polymerases: identification of interactions that reduce misincorporation rates by stabilizing the catalytically incompetent open conformation*. *Biochemistry*. 2000, 39: 11571-11580.
27. Keohavong, P.; Thilly, W. *Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, 86: 9253-9257.
28. Kidmose, R.; Vasiliev, Chetverin, A.; Andersen, G.; Knudsen, C. *Structure of the Q β replicase, an RNA-dependent RNA polymerase consisting of viral and host proteins*. *PNAS Early Edition*. 2010, 1-6.
29. Klinke, R.; Pape, H.; Kurtz, A.; Silbernagel, S. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2010, 6. Auflage.
30. Klug, S. und Famulok M. *All you wanted to know about SELEX*. *Molecular Biology Reports*. 1994, 20: 97-107.
31. Knippers, R. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2006, 9. Auflage.

32. Liu, J.; Mazumdar, D.; Lu, Y. *A Simple and Sensitive "Dipstick" Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer- Linked Nanostructures*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006, 45: 7955-7959.
33. Lottspeich, F.; Engels, J.W. *Bioanalytik*. Spektrum, Heidelberg. 2006, 2. Auflage.
34. Maintz, L.; Bieber, T.; Novak, N. *Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz*. *Deutsches Ärzteblatt*. 2006, 103: 3477-3483.
35. Mandal, M.; Breaker, R. *Gene Regulation by Riboswitches*. *Molecular Cell Biology*. 2004, 5: 451-463.
36. Mann, D.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Strehlitz, B. *In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 338: 1928–1934.
37. Mardis, E. *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. *Trends in Genetics*. 2007, 24: 133-141.
38. Maslak, M.; Martin, C. *Kinetic Analysis of T7 RNA Polymerase Transcription Initiation from Promoters Containing Single-Stranded Regions*. *Biochemistry*. 1993, 32: 4281-4285.
39. Mayer, G. *The Chemical Biology of Aptamers*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009, 48: 2672-2689.
40. Mülhardt, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum, Heidelberg. 2009, 6. Auflage.
41. Munishkin, A.; Voronin, L.; Ugarov, V.; Bondareva, L.; Chetverina, H.; Chetverin, A. *Efficient templates for Q β replicase are formed by recombination from heterologous sequences*. *Journal of Molecular Biology*. 1991, 221: 463-472.
42. Nakano, M.; Komatsu, J.; Matsuura, S.; Takashima, K.; Katsura, S.; Mizuno, A. *Single molecule PCR using water-in-oil emulsion*. *Journal of Biotechnology*. 2003, 102: 117-124.
43. Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger Biochemie*. Springer-Verlag. 2009, 4. Auflage.
44. Nutiu, R.; Li, Y. *In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers*. *Angewandte Chemie*. 2005, 44: 1061-1065.
45. Pan, Q.; Zhang, X.; Wu, H. 2006. *Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by Salmonella enterica serovar typhi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2006, 49: 4052-4060.
46. Patel, D.; Suri, A.; Jiang, F.; Jiang, L.; Kumar, P.; Nonin, S. *Structure, Recognition and Adaptive Binding in RNA Aptamer Complexes*. *Journal of Molecular Biology*. 1997, 272: 645-664.
47. Rhodes, A.; Deakin, A.; Spaulli, A. J.; Coomber, B.; Aitken, A.; Lifei, P.; Rees, S. *The Generation and Characterization of Antagonist RNA Aptamers to Human Oncostatin M*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275: 28555–28561.
48. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Ehrlich, H. A. *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase*. *Science*. 1988, 239: 487-491.

49. Sampson, T. *Aptamers and SELEX: the technology*. World Patent Information. 2003, 25: 123–129.
50. Schaffner, W.; Rugg, K.; Weissmann, C. *Nanovariant RNAs: nucleotide sequence and interaction with bacteriophage Q β replicase*. Journal of Molecular Biology. 1977, 117: 877-907.
51. Schmidt, R.; Lang, F. *Physiologie des Menschen*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 2007, 30. Auflage.
52. Schopfer, P.; Brennicke, A. *Pflanzenphysiologie*. Spektrum, Heidelberg. 2006, 6. Auflage.
53. Schuppli, D.; Miranda, G.; Tsui H.; Winkler, M.; Sogo, J.; Weber, H. *Altered 3'-terminal RNA structure in phage Q β adapted to host factor-less Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997, 94: 10239-10242.
54. Schütze, T.; Arndt, P. F.; Menger, M.; Wochner, A.; Vingron, M.; Erdmann, V. A.; Lehrach, H.; Kaps, C.; Glökler, J. *A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO—a Diversity Standard of Random Oligonucleotides*. Nucleic Acids Research. 2010, 38: 1-5.
55. Shamah, S.; Healy, J.; Cload, S. *Complex Target SELEX*. Accounts of Chemical Research. 2008, 41: 130-138.
56. Sitte, P.; Weiler, E.; Kadereit, J.; Bresinsky, A.; Körner, C. *Strasburger, Lehrbuch der Botanik*. Spektrum, Heidelberg. 2002, 35. Auflage.
57. Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Zhao, J.; Fan, C. *Aptamer-based biosensors*. Trends in Analytical Chemistry. 2008, 27: 108-117.
58. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2005, 383: 83–91.
59. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. Biomolecular Engineering. 2007, 24: 381–403.
60. Taiz, L.; Zeiger, E. *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum, Heidelberg. 2000.
61. Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. *Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis*. Biomolecular Engineering. 2007, 24: 191–200.
62. Tuerk, C.; Gold, L. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase*. Science. 1990, 249: 505–510.
63. Ugarov V. I.; Demidenko, A.; Chetverin, A. B. *Q β Replicase Discriminates between Legitimate and Illegitimate Templates by Having Different Mechanisms of Initiation*. The Journal of Biological Chemistry. 2003, 278: 44139–44146.
64. Ugarov, V. I.; Chetverin, A. B. *Functional Circularity of Legitimate Q β Replicase Templates*. Journal of Molecular Biology. 2008, 379: 414–427.
65. Urabe, H.; Ichihashi, N.; Matsuura, T.; Hosoda, K.; Kazuta, Y.; Kita, H.; Yomo, T. *Compartmentalization in a Water-in-Oil Emulsion Repressed the Spontaneous Amplification of RNA by Q β Replicase*. Biochemistry. 2010, 49: 1809-1813.

66. Weissmann, C.; Feix, G.; Slor, H. *In vitro synthesis of phage RNA: The nature of the intermediates*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1968, 33: 83-100.
67. Werstuck, G.; Green, M. *Controlling Gene Expression in Living Cells Through Small Molecule-RNA Interactions*. Science. 1998, 282: 296-298.
68. Williams, R.; Peisajovich, S. G.; Miller, O. J.; Magdassi, S.; Tawfik D. S.; Griffiths, A. D. *Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR*. Nature Methods. 2006, 3: 545-550.
69. Winkler, W.; Breaker, R. *Regulation of Bacterial Gene Expression by Riboswitches*. The Annual Review of Microbiology. 2005, 59: 487-517.
70. Wochner, A.; Cech, B.; Menger, M.; Erdmann, V.; Glökler, J. *Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling*. BioTechniques. 2007, 43: 344-353.
71. Wochner, A.; Glökler, J. *Nonradioactive fluorescence microtiter plate assay monitoring aptamer selections*. BioTechniques. 2007, 42: 578-582.
72. Wochner, A.; Menger, M.; Orgel, D.; Cech, B.; Rimmel, M.; Erdmann, V.A.; Glökler, J. *A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines*. Analytical Biochemistry. 2008, 373: 34-42.
73. Zwiauer, K. *Prophylaxe von Neuralrohrdefekten mit Folsäure*. Der Gynäkologe. 2005, 38: 46-52.

6. Anhang

6.1. Protokoll der ersten Selektionsrunde der DNA-SELEX



Tip1

Tip
Pick-Up plate
Leave plate

96 DW tip comb
Tip plate
Tip plate



Bind

Plate

Binding plate

Beginning of step:

Precollect

No

Release time [hh:mm:ss]

00:00:10

Release speed

Slow

Mixing/heating parameters:

Heating during mixing

No

1. Mixing time [hh:mm:ss]

00:06:00

1. Mixing speed

Bottom mix

2. Mixing time [hh:mm:ss]

00:00:15

2. Mixing speed

Slow

Loop count

5

End of step:

Postmix

No

Collect count

3

Collect time [s]

5



Wash1

Plate

Wash1

Beginning of step:

Precollect

No

Release time [hh:mm:ss]

00:00:10

Release speed

Bottom mix

Mixing/heating parameters:

Heating during mixing

No

1. Mixing time [hh:mm:ss]

00:00:10

1. Mixing speed

Bottom mix

2. Mixing time [hh:mm:ss]

00:05:00

2. Mixing speed

Slow

3. Mixing time [hh:mm:ss]

00:00:15

3. Mixing speed

Bottom mix

Loop count

1

End of step:

Postmix

No

Collect count

3

Collect time [s]

5



Elute

Plate

Elution

Beginning of step:

Precollect

No

Release beads

Yes

Mixing/heating parameters:

Heating temperature [°C]

70

Preheat

No

Mixing time [hh:mm:ss]

00:10:00

Mixing speed

Medium

End of step:

Postmix

No

Collect count

3

Collect time [s]

1

6.2. Protokoll der Aufreinigung mit dem „KingFisher Flex“**Tip1**

Tip	96 DW tip comb
Pick-Up plate	Tip plate
Leave plate	Tip plate

**Bind**

Plate	Bind
-------	------

Beginning of step:

Precollect	No
------------	----

Release beads	Yes
---------------	-----

Mixing/heating parameters:

Heating during mixing	No
-----------------------	----

1. Mixing time [hh:mm:ss]	00:05:00
---------------------------	----------

1. Mixing speed	Slow
-----------------	------

2. Mixing time [hh:mm:ss]	00:20:00
---------------------------	----------

2. Mixing speed	Bottom mix
-----------------	------------

3. Mixing time [hh:mm:ss]	00:00:15
---------------------------	----------

3. Mixing speed	Medium
-----------------	--------

Loop count	1
------------	---

End of step:

Postmix	No
---------	----

Collect count	5
---------------	---

Collect time [s]	5
------------------	---

**Wash_1**

Plate	Wash buffer 1
-------	---------------

Beginning of step:

Precollect	No
------------	----

Release time [hh:mm:ss]	00:00:15
-------------------------	----------

Release speed	Medium
---------------	--------

Mixing/heating parameters:

Heating during mixing	No
-----------------------	----

1. Mixing time [hh:mm:ss]	00:02:00
---------------------------	----------

1. Mixing speed	Bottom mix
-----------------	------------

2. Mixing time [hh:mm:ss]	00:05:00
---------------------------	----------

2. Mixing speed	Medium
-----------------	--------

3. Mixing time [hh:mm:ss]	00:00:15
---------------------------	----------

3. Mixing speed	Medium
-----------------	--------

Loop count	1
------------	---

End of step:

Postmix	No
---------	----

Collect count	5
---------------	---

Collect time [s]	5
------------------	---



Wash_2

Plate	Wash buffer 2
Beginning of step:	
Precollect	No
Release time [hh:mm:ss]	00:00:15
Release speed	Medium
Mixing/heating parameters:	
Heating during mixing	No
1. Mixing time [hh:mm:ss]	00:02:00
1. Mixing speed	Bottom mix
2. Mixing time [hh:mm:ss]	00:05:00
2. Mixing speed	Medium
3. Mixing time [hh:mm:ss]	00:00:15
3. Mixing speed	Medium
Loop count	1
End of step:	
Postmix	No
Collect count	5
Collect time [s]	5



Elution

Plate	Elution
Beginning of step:	
Precollect	No
Release time [hh:mm:ss]	00:00:10
Release speed	Slow
Mixing/heating parameters:	
Heating temperature [°C]	65
Preheat	No
Mixing time [hh:mm:ss]	00:25:00
Mixing speed	Slow
End of step:	
Postmix	No
Collect count	5
Collect time [s]	10



ReleaseBeads1

Plate	Bind
Release time [hh:mm:ss]	00:00:05
Release speed	Medium

Danksagung

Ich bedanke mich bei Jörn Glökler für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Vor allem danke ich ihm für seine Hilfe und die stetige Unterstützung in dieser Zeit.

Ich bedanke mich bei Thomas Schmülling für die Zweitbegutachtung meiner Diplomarbeit seitens der Freien Universität Berlin.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Hannsjörg Braun, Tatjana Schütze, Nicole Greiner und Julia Repkow für die Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit bedanken. Ich danke Ihnen für die vielen hilfreichen Tipps und Ratschläge.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten! Ich danke ihm für seine Unterstützung während meines Studiums, seiner Hilfe und seiner unendlichen Geduld.

Ich möchte meinen Eltern und meiner Schwester dafür danken, dass sie mich immer bestärkt und motiviert haben. Ohne ihre Unterstützung wäre mein Studium nicht möglich gewesen!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 26. August 2010

Kristina Blank