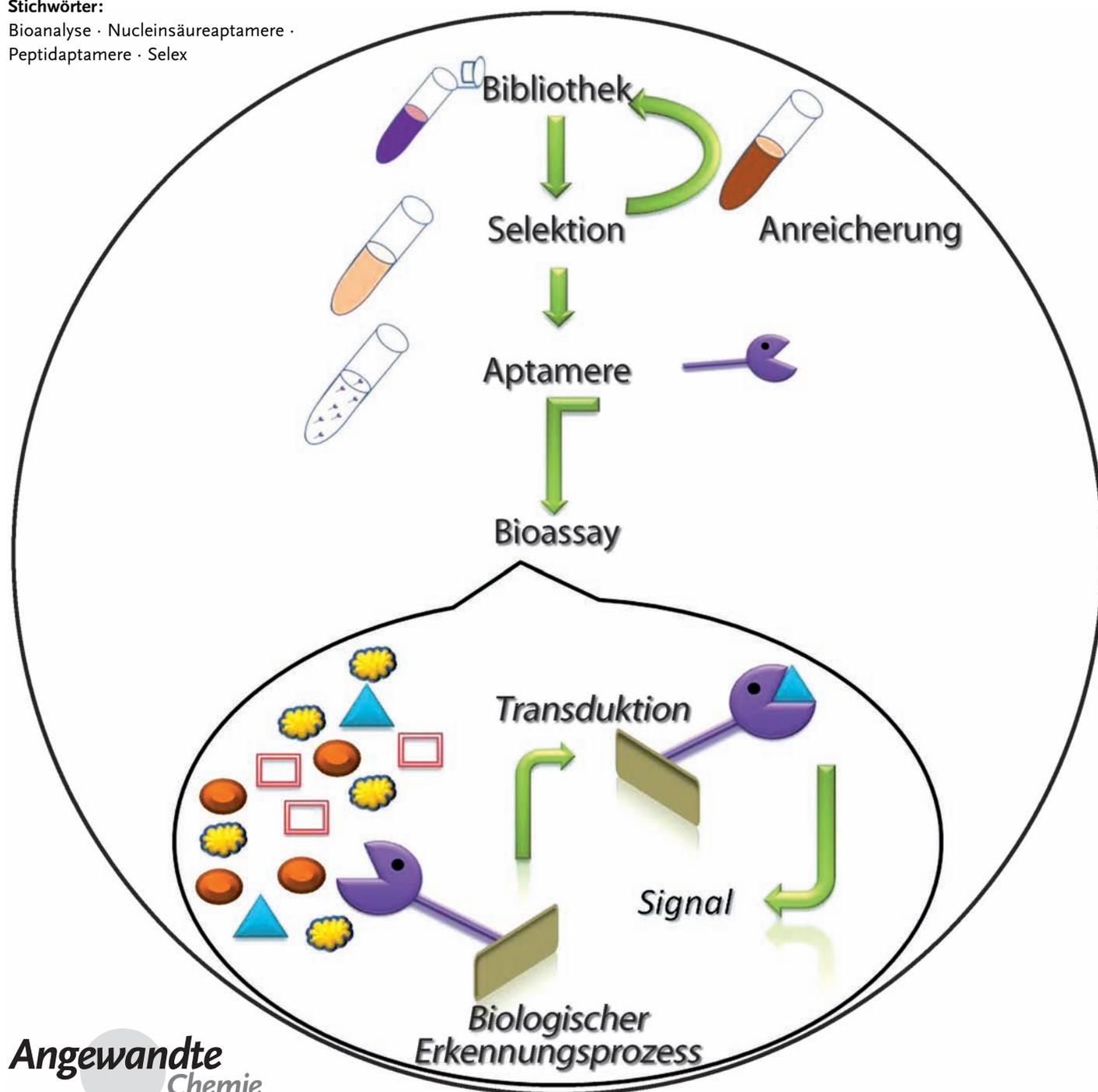


Nucleinsäure- und Peptidaptamere: Grundlagen und bioanalytische Aspekte

Marco Mascini,* Ilaria Palchetti und Sara Tombelli

Stichwörter:

Bioanalyse · Nucleinsäureaptamere ·
Peptidaptamere · Selex



In den vergangenen Jahren haben auf Nucleinsäuren und Proteine gestützte kombinatorische Moleküle die Aufmerksamkeit von Forschern verschiedener Gebiete, von der Medizin bis zur analytischen Chemie, erregt. Diese als Aptamere bezeichneten Moleküle sind als Alternativen zu Antikörpern für viele unterschiedliche Anwendungen ins Gespräch gebracht worden. Dieser Aufsatz zielt darauf, die Besonderheiten dieser kombinatorischen Moleküle zu illustrieren, die zuerst wegen ihrer Bedeutung für die molekulare Medizin Eingang in die Forschung gefunden haben, jedoch auch ein enormes Potenzial auf anderen bioanalytischen Feldern haben, auf denen historisch die Antikörper vorherrschend waren, zum Beispiel dem der Bioassays (biologisch-biochemische Testsysteme). Es wird eine Beschreibung dieser Moleküle gegeben, und die Methoden zu ihrer Selektion und Herstellung werden zusammengefasst. Darüber hinaus werden auch kritische Aspekte mit Bezug zu diesen Molekülen erörtert.

Aus dem Inhalt

1. Einführung	1343
2. Nucleinsäureaptamere	1344
3. Peptidaptamere	1348
4. Die Anwendung von Nucleinsäureaptameren	1352
5. Anwendungen von Peptidaptameren	1354
6. Gegenwärtige Herausforderungen und aktuelle Trends	1356
7. Zusammenfassung und Ausblick	1357

1. Einführung

Heutzutage reichen die wissenschaftlichen Anwendungen von Antikörpern von Untersuchungen in der Grundlagenforschung bis zur angewandten Medizin. Auf Antikörpern aufbauende Produkte sind als Biopharmazeutika zur Behandlung von Krebs und chronischen Entzündungen sowie zum Einsatz bei Transplantationen, bei Infektionskrankheiten und in der kardiovaskulären Medizin zugelassen worden.^[1] Mindestens einige hundert Antikörper sind als Wirkstoffkandidaten in der klinischen Entwicklung.^[1] Daneben sind antikörpergestützte Bioassays in klinischen, umweltchemischen und lebensmittelchemischen Analysen Routine. Die meisten dieser Bioassays beruhen auf dem IgG-Molekül. IgG ist ein Protein von 150 kDa Molmasse, bestehend aus vier Polypeptidketten mit Disulfidbindungen, die für seine Stabilität unerlässlich sind. Darüber hinaus zeigen diese Proteine ein komplexes Glykosylierungsverhalten. Diese Merkmale bedingen einen vergleichsweise schwierigen und teuren Herstellungsprozess, der auf dem Einsatz von Tieren beruht. Hinsichtlich der Entwicklung stabiler rekombinanter Antikörperfragmentbibliotheken sind große Fortschritte gemacht worden; die Suche nach wertvollen Alternativen ist aber dennoch weiterhin vonnöten.^[2]

Neuerdings hat sich das Augenmerk zu Affinitätsmolekülen hin verlagert, die durch Ansätze der evolutionären Molekularbiologie erzeugt werden^[3–6] (Abbildung 1). Dabei wird eine kombinatorische Bibliothek aufgebaut, und verbesserte Varianten werden durch einen Selektionsprozess identifiziert. Der Selektionsvorgang wird in vitro durchgeführt, was eine höchst zuträgliche Steuerung der Selektion selbst ermöglicht, wodurch sich wiederum die Merkmale der identifizierten Affinitätsmoleküle kontrollieren lassen.

Der Zweck dieses Aufsatzes besteht darin, die Besonderheiten und die Anwendungen der beiden Hauptklassen von durch evolutionäre Ansätze erzeugten Affinitätsmolekülen – also Nucleinsäureaptamere und kombinatorische

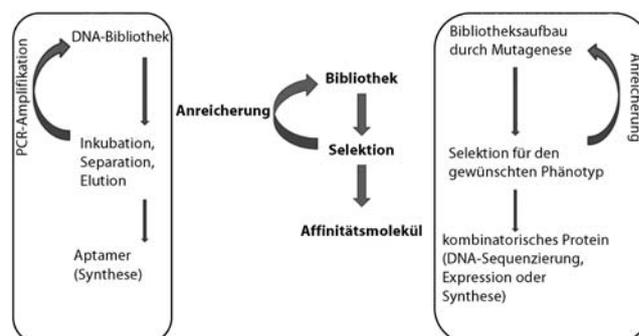


Abbildung 1. Schema des evolutionären Ansatzes. Die Nucleinsäureaptamere (Kasten links) werden durch Inkubation der Nucleinsäurebibliothek (DNA-Bibliothek) mit einem Zielmolekül nach Wahl, der Trennung gebundener von nichtgebundenen Nucleinsäuren, Elution der gebundenen Nucleinsäurespezies und Amplifikation der eluierten Nucleinsäurespezies hergestellt. Im Fall der kombinatorischen Proteine (Kasten rechts) wird eine kombinatorische Bibliothek mutierter Gene synthetisiert. Verbesserte Varianten werden über einen Selektionsprozess identifiziert. Weitere Verbesserungen können durch Reiteration der Zyklen aus Mutation und Selektion erreichbar sein. Schlussendlich werden ausgesuchte Klone durch DNA-Sequenzierung charakterisiert, um nützliche Mutationen zu identifizieren. In der Mitte wird die allgemeine Vorgehensweise beschrieben.

Nichtimmunglobulinproteine (die hier aus Gründen der Einfachheit als Peptidaptamere bezeichnet werden) – in Bioassays darzulegen.

Um die Terminologie zu erhellen sei angemerkt, dass der Begriff „Aptamer“, der sich vom lateinischen „aptus“

[*] Prof. M. Mascini, Dr. I. Palchetti,^[1] Dr. S. Tombelli^[2]
Dipartimento di Chimica „Ugo Schiff“
Università degli Studi di Firenze
Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (Italien)
E-Mail: marco.mascini@unifi.it

[*] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

(passen) und dem griechischen „meros“ (Teil) herleitet, erstmals im Jahr 1990 von Ellington und Szostak verwendet wurde, um RNA-Moleküle zu beschreiben, die an kleine organische Farbstoffmoleküle zu binden vermögen.^[7] Seit dieser Zeit werden kurze DNA- oder RNA-Stränge, die eine bestimmte dreidimensionale Konformation einnehmen und aufgrund ihrer Fähigkeit, bestimmte Moleküle anzusteuern, ausgewählt wurden, als Nucleinsäureaptamere bezeichnet. Über die Entwicklung kombinatorischer Proteine als Alternative zu Antikörpern (die aus einer variablen Peptidsequenz bestehen, die in ein konstantes Gerüstprotein inseriert ist) wurde einige Jahre danach berichtet. Unter anderem hat die Gruppe von Nygren^[8] im Jahr 1995 eine kombinatorische Bibliothek eines α -helikalen bakteriellen Rezeptors beschrieben. Ein Jahr später haben Colas und Kollegen^[9] über die Entwicklung eines auf Thioredoxin A (TrxA) basierenden Affinitätsproteins berichtet. Diese Autoren definierten dieses auf TrxA aufbauende Molekül in Analogie zu den Nucleinsäureaptameren als „Peptidaptamer“. Heute finden sich in der Literatur Berichte über unterschiedliche kombinatorische Nichtimmunglobulinproteine, und all diese Moleküle tragen verschiedene Namen. Um einen rationalen Ansatz zur Verfügung zu haben, haben wir die gewaltige Menge an Publikationen auf diesem Gebiet unter einem verallgemeinernden Begriff zusammengefasst. Wir haben auf Gründen der Zweckmäßigkeit den Begriff Peptidaptamere gewählt. Unserer Auffassung nach wird die Verwendung des Begriffs „Aptamer“ es dem Leser erleichtern, das Ziel dieser Übersicht zu erkennen: Es sollen die durch einen evolutionären Ansatz zugänglichen Affinitätsmoleküle (Nucleinsäuren wie auch Proteine) erörtert werden, die interessante Alternativen zu Antikörpern darstellen.

2. Nucleinsäureaptamere

2.1. Definition und Beschreibung

Nucleinsäureaptamere sind kurze Einzelstrang-DNA- oder RNA-Oligonucleotide, die sequenzabhängige stabile dreidimensionale Strukturen annehmen. Diese Eigenschaft macht sie zu effizienten Bindungsmolekülen, die befähigt sind, Ziele zu binden, die von kleinen Ionen (z. B. Zn^{2+} ,^[10] 56 Da) und niedermolekularen organischen Verbindungen (z. B. organische Farbstoffe,^[11] neutrale Disaccharide^[12] und

Aminoglycosid-Antibiotika^[13]) bis hin zu großen Molekülen wie Glykoproteinen (wie CD4^[14]) oder sogar einem komplexen Ziel (z. B. lebende Zellen^[15]) reichen. Die Funktionalität der Nucleinsäureaptamere gründet sich auf ihre stabilen dreidimensionalen Strukturen, die von der Primärsequenz, der Länge des Nucleinsäuremoleküls und den Umgebungsbedingungen abhängt. Die Größe von Aptameren kann zwischen 25 und 90 Basen schwanken,^[5,6] und ihre typischen Motive sind Stammstrukturen,^[16] interne Schlaufen, purinreiche Hervorwölbungen, Haarnadelstrukturen, Vierfachschaufen,^[17] Pseudoknoten,^[18,19] „Kissing“-Komplexe^[20,21] oder G-Quadruplex-Strukturen^[22–24] (namentlich Tertiärstrukturen, die den bei RNA und DNA beobachteten ähneln^[25]). Einige Beispiele sind in Abbildung 2 zusammengetragen. In Gegenwart des Ziels unterziehen sich die meisten Aptamere einer Konformationsänderung; ihre dreidimensionale Faltung erzeugt eine spezifische Bindungsstelle für das betreffende Ziel. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und seinem Ziel sind durch eine Kombination aus Komplementarität der Form oder Gestalt, Stapelwechselwirkungen zwischen aromatischen Verbindungen und den Nucleobasen des Aptamers und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen und Wasserstoffbrücken charakterisiert.^[26]

Nucleinsäureaptamere binden ihre Ziele mit hoher Spezifität, sodass die Unterscheidung nachrangiger Strukturunterschiede von Zielen und mit ihnen verwandten Molekülen erreichbar ist. So haben zum Beispiel Theophyllin und seine Analoga, Coffein und Theobromin, ähnliche chemische Strukturen. Coffein unterscheidet sich vom Theophyllin durch eine einzige Methylgruppe, wohingegen das Theobromin tatsächlich nur ein Isomer des Theophyllins ist, das sich durch die Position einer Methylgruppe von ihm unterscheidet. Die Anti-Theophyllin-RNA-Aptamere zeigen ein hohes Maß an molekularer Unterscheidbarkeit beider Analoga, und es ist nachgewiesen worden, dass die Bindungsaffinität eines RNA-Aptamers zu Theophyllin 10 000-fach höher ist als zu Coffein.^[27] In gleicher Weise können RNA-Aptamere, die darauf selektiert wurden, L-Arginin enantioselektiv zu binden, dieses Ziel mit 12 000-fach höherer Affinität binden als D-Arginin.^[28]

Die Affinität unterliegt sowohl bei den Aptameren für kleine Moleküle wie den Aptameren für Proteine großen Schwankungen. Zu den Eigenschaften kleiner Moleküle, die eine leichte Erkennung fördern und zu Affinitäten im mi-



Marco Mascini ist Professor für analytische Chemie an der Universität Florenz (Italien) und Mitglied der Redaktionsbeiräte mehrerer internationaler Fachzeitschriften. Er ist Autor von über 400 Veröffentlichungen zu Biosensoren. Seine wissenschaftlichen Hauptinteressen sind: die Entwicklung von Biosensoren für unterschiedliche Anwendungen in Umweltchemie, Lebensmittelanalyse und klinisch-analytischer Chemie; analytische Chemie mit ionenselektiven Elektroden und elektrochemische Gassensoren; die Entwicklung neuer Immobilisierungsverfahren für Biomoleküle auf Oberflächen.



Ilaria Palchetti ist Assistenzprofessorin für Chemie an der Universität Florenz (Italien). Sie promovierte in Umweltwissenschaften im Jahr 1998 an der Universität Florenz. Ihre Forschungsinteressen liegen im Bereich Sensor- und Biosensorentwicklung, analytische Chemie, Elektrochemie sowie Nano- und Mikrotechniken für die (Bio)Sensorherstellung.

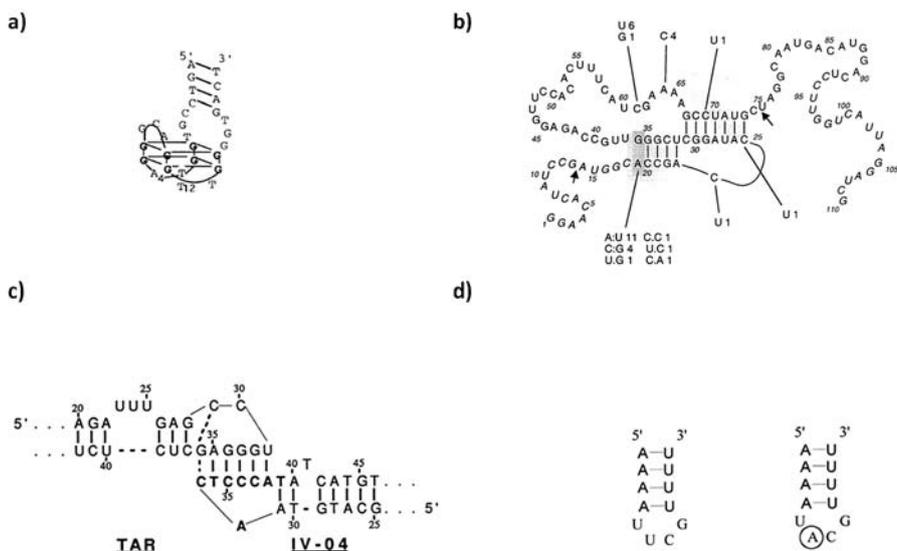


Abbildung 2. Beispiele für Struktur motive von Nucleinsäureaptameren: a) ein thrombinbindendes Aptamer, das zu einer G-Quadruplexstruktur aufgeklappt ist;^[24] b) Sequenz des Biotin-Aptamerhauptklons, zu einem Pseudoknoten aufgeklappt;^[19] c) IV-04-Aptamer gegen transaktivierungsreaktive RNA (TAR-RNA), einen RNA-DNA-, "Kissing"-Komplex bildend;^[20] d) Sequenz zu einer Haarnadelstruktur gefalteter Aptamere.^[16]

kromolaren Bereich betragen,^[29,30] gehören Planarität oder das Vorhandensein positiv geladener Gruppen und H-Brücken-Donoren oder -Akzeptoren,^[31] und das selbst, wenn Aptamere für Moleküle mit hydrophobem Charakter ebenfalls selektiert wurden.^[32,33]

Aptamere für Proteine zeigen infolge des Vorhandenseins größerer, komplexerer Bereiche mit Strukturen, die reich an H-Brücken-Donoren oder -Akzeptoren sind, im Allgemeinen höhere Affinitäten. Affinitäten im nanomolaren und subnanomolaren Bereich sind für Aptamere gegen verschiedene Proteine wie Thrombin,^[22] ein Nucleocapsidprotein (2 nM)^[34] und den Thrombocytenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF) (0.1 nM)^[35] experimentell ermittelt worden.

2.2. Der Selektionsvorgang und seine Evolution

Der Aptamerisierungsprozess, SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) genannt,



Sara Tombelli studierte Chemie an der Universität Florenz (Italien) und promovierte dort im Jahr 2000 in Umweltwissenschaften. Ihre Kompetenzen liegen auf dem Feld der analytischen Chemie, und hier insbesondere im Bereich der Sensor- und Biosensortechnik, der Nucleinsäureveränderungstechniken und der Immobilisierung von Biomolekülen. Sie ist Autorin von über 60 Publikationen in internationalen wissenschaftlichen Fachzeitschriften und Büchern.

wurde erstmals im Jahr 1990 und praktisch gleichzeitig von den Arbeitsgruppen von Ellington^[7] und Tuerk^[36] vorgestellt. Diese Methode besteht im wesentlichen aus der wiederholten Bindung, Selektion und Amplifikation von Aptameren aus der Ausgangsbibliothek, bis ein oder mehr Aptamere, die die gewünschten Merkmale aufweisen, isoliert werden konnten.^[7,36] Das SELEX-Verfahren ist in den vergangenen Jahren ausgiebig diskutiert worden,^[37-43] und es sind mehrere Modifikationen vorgenommen worden. Eine kurze Beschreibung der Methode und ihrer neuesten Fortschritte wird im Folgenden gegeben.

Der erste und sehr bedeutsame Schritt des SELEX-Verfahrens ist die Auswahl und Synthese der Bibliothek. Ein Teil des enormen Potenzials der Aptamere liegt genau in der Tatsache begründet, dass Bibliotheken mit einer sehr großen Zahl potenzieller Liganden innerhalb weniger Tage erschaffen und angereichert werden können.

Im Regelfall bestehen Aptamerbibliotheken aus 10^{13} – 10^{18} zufälligen Oligonucleotidsequenzen,^[44,45] und dies wird um so eindrucksvoller, wenn man es mit herkömmlichen Bibliotheken potenzieller Wirkstoffe vergleicht, die im Allgemeinen aus nicht mehr als 10^6 unterschiedlichen Molekülen bestehen und für eine Durchmusterung Monate erfordern. Wenn man eine Bibliothek erschaffen will, müssen mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden, so etwa der Komplexitätsgrad der Bibliothek und die Chemie der Nucleotide.

Insbesondere die Chemie der Nucleotide spielt eine zentrale Rolle hinsichtlich der Stabilität der Aptamere gegen Abbau und kann die Affinität und die Spezifität der selektierten Aptamere für ihre Ziele beeinflussen, da viele der Nucleotide im Kernbereich der Aptamere die Gesamtstruktur der Bindungsstelle festlegen.^[41,46] Tatsächlich wurde die Modifikation von Nucleotiden am häufigsten eingesetzt, um die enzymatische oder chemische Spaltung von Einzelstrangoligonucleotiden zu umgehen. So sind beispielsweise die Modifikation von Pyrimidinen in der 5'-Position mit I, Br, Cl, NH_3 und N_3 , sowie in der 2'-Position mit NH_2 , F und OCH beschrieben worden.^[39] Die Modifikation des Phosphodiestergerüsts – zum Beispiel durch den Einsatz α -thiosubstituierter Desoxyribonucleosidtriphosphate – hat sich als nützliche Methode erwiesen, die bei DNA-Aptameren erfolgreicher war als bei RNA-Aptameren.^[47] Eine Alternative stellt die Erzeugung als „Spiegelmer“ bezeichneter enantiomerer Aptamere dar. Diese Technik stützt sich auf die Erschaffung eines Spiegelbilds der Zielstruktur und die Selektion eines Aptamers für dieses Spiegelbild. Ein Stereoisomer des selektierten Aptamers wird dann kreiert (zum Beispiel das Spiegelmer), welches spezifisch für das Ziel, aber infolge der

Substitution der natürlichen D-Ribose durch L-Ribose nicht empfindlich für enzymatischen Abbau ist.^[48–50]

Der andere Faktor, der die Auslegung der Bibliothek beeinflusst, ist die Auswahl der konstanten Region. Die Zufallsaptamersequenz muss 5'-wärts und 3'-wärts von konstanten Bereichen flankiert sein, deren Länge für gewöhnlich 20–25 Basenpaare beträgt, und die Hybridisierungsstellen für eine Anzahl von Schritten im Verlauf des SELEX-Prozesses bereitstellen. Die 3'-wärts flankierende Sequenz wirkt im Allgemeinen als Anlagerungsstelle für Primer für die Reverse Transkriptase, und die 5'-wärts flankierende Sequenz wirkt während des Amplifikationsschritts des SELEX-Protokolls als Anlagerungsstelle für PCR-Primer. Der Entwurf der konstanten Region für die SELEX-Prozedur ist sogar noch wichtiger als bei einer normalen PCR, weil der vollständige SELEX-Prozess bis zu 50 PCR-Zyklen umfassen kann. Jedes Artefakt würde daher in der angereicherten Bibliothek drastisch amplifiziert vorliegen. Nachdem eine geeignete Aptamerbibliothek hergestellt worden ist, kann sie das SELEX-Protokoll durchlaufen, welches mit der entworfenen Doppelstrang-DNA-Bibliothek beginnt, die entweder (zur RNA-Selektion) transkribiert oder (zur Selektion von Einzelstrang-DNA) einer Strangtrennung unterworfen wird, um sie in eine für die Selektion geeignete Form zu überführen. Im nachfolgenden Schritt werden das Ziel und die Bibliothek unter für die Bindung günstigen Bedingungen zusammengebracht, wobei die Sequenzen mit der höchsten Affinität an das Ziel binden werden. Diese Sequenzen werden dann von denen mit geringerer Affinität abgetrennt. Dieser Schritt kann durch Anheftung der Aptamere und eine unterstützende Festphase wie etwa Sepharose erfolgen; die gewünschten Aptamere werden gezielt eluiert, nachdem die Bindung erfolgt ist.^[5,51] Alternativ dazu können Aptamer und Ziel frei in Lösung zusammengebracht werden. Danach kann der Ziel-Aptamer-Komplex durch Filtrieren durch Nitrocellulose geborgen werden.^[38,52] Diese Methode wird verbreitet eingesetzt, obgleich es wichtig ist, anzumerken, dass sie nur anwendbar ist, wenn das Zielmolekül ein Protein ist. Ein negativer Selektionsschritt, bei dem die Aptamere in Abwesenheit des Ziels über einen Cellulosefilter oder über die Matrix, an der das Ziel immobilisiert ist, geleitet werden (negative SELEX), wird in diesem Stadium ebenfalls häufig eingefügt. Dies dient zur Eliminierung von Aptameren, die in einer zielunabhängigen Weise an den Filter oder die Matrix binden.^[28] Eine Gegenselektion kommt auch manchmal zum Einsatz; dabei werden Aptamere entfernt, die an Strukturen binden, die denen des Ziels ähnlich sind.^[53] Die hochaffinen Sequenzen werden dann durch revers-transkribierende PCR (RT-PCR) (im Fall von RNA-Aptameren) oder durch PCR im Fall von DNA-Aptameren amplifiziert, um eine neue Aptamerbibliothek zu erzeugen, in der die Aptamere mit hoher Affinität angereichert vorliegen. Der Gesamtprozess wird dann wiederholt, was zu einer immer geringeren Zahl eigentümlicher Sequenzen mit immer höherer Affinität für das Ziel führt, die jeweils zurückgehalten werden. Man beachte, dass während jeder Selektionsrunde die Bindungsbedingungen für die Aptamere und das Ziel im Allgemeinen immer stringenter gestaltet werden, um den Selektionsdruck auf die verbliebenen Aptamere schrittweise zu erhöhen. Ein

vollständiger SELEX-Prozess (der zwischen 8 und 15 Zyklen umfasst) wird mehrere individuelle Sequenzen erbringen, die analysiert und nach dem Homologiegrad untereinander zu mehreren Klassen zusammengefasst werden. Die weitere Untersuchung umfasst die Analyse konservierter Motive der Aptamersequenz(en) und der für die Wechselwirkung mit dem Ziel minimal erforderlichen Aptamerdimensionen.^[41]

In jüngerer und in weiter zurückliegender Zeit sind an der SELEX-Prozedur^[54] diverse Modifikationen vorgenommen worden (Table 1),^[55–85] um die Aptamerselektivität zu erhöhen (gemischte, Gegen-, negative und subtraktive SELEX), um die für die Selektion erforderliche Zeit zu vermindern (automatisierte SELEX), oder um die Effizienz des Partitionsschritts zu erhöhen (CE-SELEX und Non-SELEX). Darüber hinaus sind besondere SELEX-Protokolle erdacht worden, um Aptamere gegen bestimmte Ziele zu selektieren, wie zum Beispiel Komplexziel-SELEX oder Zell-SELEX, oder für Proteomstudien und die Biomarkersuche.^[86] All diese verschiedenen SELEX-Prozeduren, die darauf zielen, die Selektion auf Aptamere mit bestimmten gewünschten Merkmalen zu lenken, sind in dieser Übersicht zitiert worden, um einen wichtigen Unterschied zwischen Aptameren und Antikörpern herauszuheben. Im Unterschied zu der großen Auswahl möglicher Modifikationen der SELEX-Bedingungen ist die klassische Herstellung von Antikörpern durch Immunisierung von Tieren nur schwierig zu beeinflussen, da die im Tier vorherrschenden physiologischen Bedingungen der führende Einflussfaktor sind.

Spezielle und innovative SELEX-Prozeduren wie das AFM-SELEX sind jüngst beschrieben worden.^[87] Die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) wurde eingesetzt, um Aptamere mit hoher Affinität für das gewünschte Ziel zu erhalten: Die Selektion wurde in nur drei Runden abgeschlossen, und viele der dabei erhaltenen Aptamere hatten eine höhere Affinität zu dem ausgewählten Ziel – hier: Thrombin – als solche, die durch eine konventionelle SELEX selektiert wurden. Eine neuere Studie stellt ein automatisches, auf magnetischen Kügelchen aufbauendes Mikrofluidsystem vor, das ein Zufalls-ssDNA-Extraktionsgerät und ein „On-chip“-Nucleinsäureamplifikationsgerät (Mikro-PCR) für die schnelle Durchmusterung von Aptameren integriert.^[88] Der Gesamtprozess wurde auf einem einzelnen Chip automatisch in einer im Vergleich zu anderen SELEX-Protokollen kürzeren Zeit und mit vermindertem Proben- und Reagenzienbedarf durchgeführt.

Darüber hinaus wurde kürzlich eine alternative mikrofluidische SELEX auf Grundlage einer mikromagnetischen Trennung publiziert.^[89] Der mikromagnetische Trennungschip integriert ferromagnetische Mikrostrukturen, um an die Magnetkügelchen gebundene Aptamere einzufangen, und ließ im Partitionierungsschritt einen hohen Wirkungsgrad erkennen. Als Beispiel wurde eine Aptamerselektion für Streptavidin durchgeführt, die in nur drei Runden hochaffine Aptamere mit Dissoziationskonstanten zwischen 25 und 65 nM erbrachte.

Tabelle 1: Verschiedene Modifikationen des SELEX-Prozesses.

Bezeichnung	Modifikation	Ziel	Lit.
Automatisierte SELEX	Einsatz automatisierter Systeme für den Selektionsvorgang	Reduktion des Zeitaufwands für die Selektion	[55, 56]
Gemischte SELEX	Einsatz kleiner Liganden, die die Sequenz zu einer bestimmten Region des Ziels lenken	Selektion von Aptameren gegen ein bestimmtes Epitop	[57, 58]
Kapillarelektrophorese-SELEX	Einsatz der Kapillarelektrophorese für die Sequenzaufreinigung	Verbesserung des Trennprozesses von an das Ziel gebundenen Sequenzen und anderen	[59–61]
Zell-SELEX	Einsatz lebender Zellen als Ziel	Selektion von Aptameren gegen ganze, lebende Zellen	[62, 63]
Chimären-SELEX	Einsatz kombinierter Populationen (z. B. Fusion bereits selektierter Sequenzen)	Selektion von doppelt-funktionalen Aptameren	[64]
Komplexziel-SELEX	Einsatz von Membranpräparationen oder Zellen als Ziele im Selektionsprozess	Selektion von Aptameren gegen Zelloberflächenproteine	[65]
Konditionale SELEX	Einsatz eines Regulatormoleküls während der Selektion	Selektion von Aptameren, deren Bindung an das Zielmolekül reguliert werden kann	[66]
Gegen-SELEX	Einsatz von Molekülen bei der Selektion, die dem Ziel ähnlich sind, um Sequenzen auszuschließen, die an sie binden	Selektion hochspezifischer Aptamere	[27, 55]
Kovalente SELEX	Einsatz von Nucleotiden, die mit aktivierbaren Gruppen modifiziert werden können	Selektion von Aptameren, die kovalent an das Zielprotein binden können (Photoaptamere)	[67, 68]
Dekonvolutions-SELEX	Entwicklung einer Sekundärselektion	Aufteilung von Aptamervorräten, die gegen mehrere Ziele evolviert worden sind	[69, 70]
FACS-SELEX	Einsatz eines fluoreszenzaktivierten Zellsortiergeräts zur gleichzeitigen Differenzierung und Separierung bindender und nichtbindender Subpopulationen von Zellen	Rückgang falsch-positiver Ergebnisse in Zellselektionsansätzen	[71]
FluMag-SELEX	Einsatz von Fluoreszenzmarkierungen zur DNA-Quantifizierung, und Einsatz magnetischer Kügelchen zur Zielimmobilisierung	Einsatz sehr kleiner Mengen des Ziels zur Aptamerselektion; rasche und effiziente Trennung gebundener von ungebundenen Molekülen	[72]
Genomische SELEX	Bibliothek besteht aus fragmentierter genomischer DNA	Selektion natürlicher Sequenzen, die bioaktive Proteine binden	[73]
Spiegelbild-SELEX	Einsatz von Spiegelanaloga natürlicher Nucleotide (L-Ribose oder L-Desoxyribose)	Selektion nucleaseresistenter Aptamere	[56]
Mod-SELEX	SELEX an einer Bibliothek von Oligonucleotiden mit chemischen Substitutionen	Herstellung stabiler (nucleaseresistenter) Aptamere und Erzeugung von Aptameren mit Konformationen und Zielbindungsoberflächen, die bei Verwendung von DNA oder RNA nicht zugänglich wären	[74]
Mehrstadien-SELEX	Einsatz fusionierter Vertreter aus einem bereits durchmusterten „Pool“	Aufklärung der Mechanismen allosterischer Wechselwirkungen an Aptameren	[75]
Negative SELEX	Einsatz eines „negativen“ Selektionszyklus durch alleinige Inkubation mit der für die Zielimmobilisierung verwendeten Matrix	Selektion hochspezifischer Aptamere	[76]
Non-SELEX	Wegfall des PCR-Schritts	Verbesserung des Trennungsschritts	[77]
Primerfreie SELEX (bei der genomischen SELEX)	Primeranlagerungssequenzen werden vor der Selektion aus der Genombibliothek entfernt	Verhinderung von Artefakten infolge der Anwesenheit von Strukturen, die durch Basenpaarbildung zwischen festliegenden flankierenden Sequenzen der Bibliothek mit den zentralen, genomabgeleiteten Fragmenten entstanden sind.	[78]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Bezeichnung	Modifikation	Ziel	Lit.
SELEX-SAGE (serielle Analyse der Genexpression) oder Hochdurchsatz-SELEX	Ein Teil des SAGE-Protokolls besteht in der Verknüpfung von Oligomeren aus der SELEX mit längeren DNA-Molekülen, die hoch effizient sequenziert werden können	Sequenzierung bindender Sequenzen (bis zu einigen Tausend)	[79]
SOMAmer (Slow Off-rate Modified Aptamers)	Selektion von Aptameren mit „rational entworfenen“ modifizierten Nucleotiden	Vergrößerung des Zielbereichs, für den Aptamere selektiert werden können, und Selektion hochqualitativer Bindungsaptamere für den Einsatz in proteomischen Multiplex-Arrays	[80]
Subtraktive SELEX	Einsatz von Molekülen in der Komplexziel-SELEX, die dem Ziel (das heißt, Zellen) ähnlich sind, um an sie bindende Sequenzen auszuschließen	Verbesserung der Aptamerselektivität	[81]
Maßgeschneiderte SELEX	Bibliothek mit reduzierten oder keinen fixierten Regionen	Minimierung der Aptamergröße	[82, 83]
TECS-SELEX (target expressed on cell surface-SELEX)	Anstelle des aufgereinigten Proteins werden rekombinierte Proteine, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden, unmittelbar als Selektionsziel eingesetzt	Selektion von Aptameren mit hoher Spezifität und Affinität für irgendwelche Zelloberflächenproteine; auch, wenn das aufgereinigte Proteinziel nicht leicht greifbar ist	[84]
Umschalt-SELEX	Einsatz unterschiedlicher Ziele in der Selektion	Selektion von Aptameren, die an mehrere verwandte Proteine binden können	[85]

3. „Peptidaptamere“

3.1. Definition und Beschreibung

Nach der Definition von Colas et al. aus dem Jahr 1996^[9] sind Peptidaptamere kombinatorische Proteinmoleküle, bei denen eine variable Peptidsequenz mit Affinität für ein bestimmtes Zielprotein an einem inerten, konstanten Gerüstprotein dargeboten wird.^[9,90–95] Es handelt sich um extrem einfache Moleküle, die nach ihrer Affinität zum Zielprotein oder einer niedermolekularen Substanz aus einer kombinatorischen Bibliothek selektiert und in Bakterienzellen, z. B. in *E. coli*, exprimiert worden sind. Beide Termini der variablen Sequenz werden mit dem inerten Gerüst fusioniert, wodurch die Peptidaptamere doppelt eingeschränkt sind. Diese doppelte Einschränkung unterscheidet Peptidaptamere von anderen künstlichen kombinatorischen Proteinmolekülen, die oft aus zufälligen Peptidsequenzen bestehen, die terminal an ein Trägerprotein oder ein anderes Makromolekül angefügt sind. Tatsächlich schließt der Begriff andere Typen doppelt eingeschränkter kombinatorischer Proteine, die komplexer als Peptidaptamere sind, nicht ein, weil die Zielbindungsflächen auf nichtzusammenhängenden Peptidsequenzen bestehen, die auf mehrere Sekundärstrukturelemente oder über mehrere variable Schlaufen verteilt sind,^[90,91] wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

Diese doppelt beschränkten kombinatorischen Proteine haben ähnliche Merkmale und Anwendungen wie Peptidaptamere. Insbesondere zeigen alle von ihnen Eigenschaften der molekularen Erkennung; diesbezüglich ähneln sie Antikörpern, jedoch mit verbesserten Charakteristika wie geringer Größe, hoher Stabilität, guter Löslichkeit, hoher Ausbeute bei der bakteriellen Expression, der Möglichkeit der chemi-

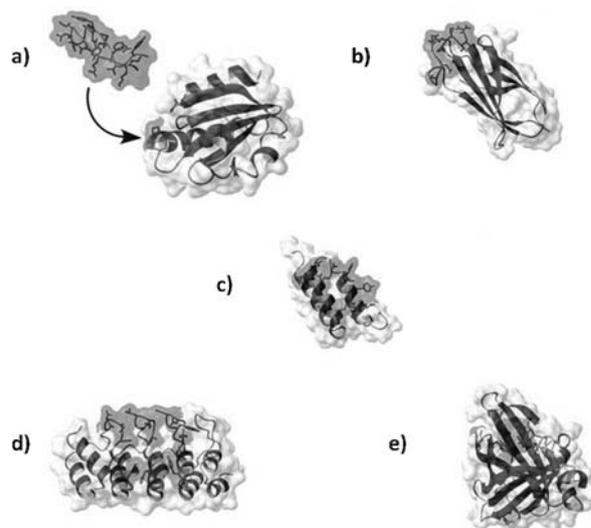


Abbildung 3. Verschiedene Proteingerüstprinzipien beim Entwurf künstlicher Bindungsproteine. Die Gerüste werden durch ein in das Gerüst inseriertes Zufallspeptid – für gewöhnlich eine Schlaufe – wie im Fall des Thioredoxins (a) oder durch Modifizierung bestimmter nichtzusammenhängender Positionen diversifiziert, die über mehrere Sekundärstrukturelemente oder mehrere variable Schlaufen (zum Beispiel in Schlaufen wie beim Fibronectin III (b), auf flachen Oberflächen wie beim Protein A (c), in Kombinationen aus Schlaufen und Helices wie im Fall des Ankyrin-Wiederholungsproteins (d) oder in Hohlräumen wie beim Lipocalin (e)) verstreut liegen können. Zielbindungsvarianten der resultierenden Bibliotheken werden in der Folge unter Einsatz von Selektions- oder Durchmusterungstechniken isoliert. Nachdruck aus Lit. [3].

schen Synthese, rascher Faltung sowie – in manchen Fällen wie einem Affibody-Molekül (Affinitätsmoleküle auf Basis von Protein-A-Gerüsten; siehe Tabelle 2) – dem Fehlen von

Tabelle 2: Beispiele für Gerüste, die zur Erzeugung von Affinitätsliganden verwendet wurden, Selektionsmethoden und Angaben zur kommerziellen Verwertung.

Name	Gerüst	Variiertes Strukturelement	Selektionsmethode	Lit.	Kommerzielle Nutzung
<i>Peptidaptamer</i>	Thioredoxin A (TrxA)	1 Schlaufe	Hefe-Zwei-Hybridsystem, Phagen-display, Säugtierzellsystem	[9, 105]	... (bis 2007: Aptanomics)
<i>Peptidaptamer</i>	Staphylokokkennuclease	1 Schlaufe	Funktionelle Durchmusterung	[112]	...
<i>Peptidaptamer</i>	Humanes Stefin A	3 Stellen	Hefe-Zwei-Hybridsystem	[106]	...
<i>Peptidaptamer</i>	Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)	Schlaufenrandomisierung	Visuelle Durchmusterung	[111]	...
<i>Ligandenregulierte Peptidaptamere</i>	FKBP-Peptid-FRB-GST	Trimerer Komplex		[108]	...
<i>Microbodies</i>	Cystinknoten-Mikroproteine (Knottine)	1 Schlaufe in zwei β -Strängen	mRNA-Display	[119]	... (bis 2007: Nascacell)
<i>Affibody</i>	Protein A	2 α -Helices	Phagendisplay	[96]	www.affibody.com www.abcam.com
<i>Anticalin</i>	Lipocalin	4 Schlaufen	Phagendisplay	[109]	www.pieris-ag.com Pieris libraries
<i>Adnectin</i>	Fibronectin III	2–3 Schlaufen	Phagendisplay, mRNA-Display, Hefe-Zwei-Hybridsystem	[110]	www.adnexstx.com PROfusion libraries
<i>DARPin</i>	Ankirin	β -Kehre und α -Helix	Ribosomendisplay	[113]	www.molecularpartners.com
<i>Kunitz-Domäne</i>	APPI	Einzelne Schlaufe	Phagendisplay	[121]	www.dyax.com

Disulfidbindungen und freien Cysteinresten. Wie in Lit. [96] berichtet wird, die die Merkmale der Affibody-Moleküle heraushebt, ist die von Disulfidbindungen unabhängige hohe Stabilität ein bedeutender Vorteil, der hohe Ausbeuten bei der bakteriellen Expression begünstigt und intrazelluläre Anwendungen möglich macht. Das Fehlen intramolekularer Cysteine eröffnet die Möglichkeit, einen einzelständigen, C-terminalen Cysteinrest zum Zweck der Markierung oder andere chemischen Modifizierungen einzuführen.

Die Gestalt dieser künstlichen beschränkten kombinatorischen Proteine wird letztlich sowohl durch ihre Aminosäurezusammensetzung als auch durch die Sequenz des Peptids und die Primär- und Tertiärstruktur des Gerüstproteins festgelegt.^[94]

Wichtig ist der Umstand, dass die Bindungsaffinität dieser künstlichen Proteine durch die durch das Gerüst auferlegte Beschränkung stark erhöht ist. Dies ist der Hauptvorteil bei der Verwendung von konformativ eingeschränkten Peptiden gegenüber unstrukturierten linearen Peptiden.^[97,98]

3.2. Selektion

Es ist offenkundig, dass sich die Selektion von Peptidaptameren, von einem technischen Standpunkt aus betrachtet, vollständig von der bei Nucleinsäureaptameren zum Einsatz kommenden unterscheidet. Das grundlegende Prinzip ist jedoch ähnlich: der Einsatz kombinatorischer Strategien zur Erzeugung von Diversität und zur Erschaffung eines „Pools“ unterschiedlicher Kandidaten (der Bibliothek), die Selektion (um Kandidaten mit bestmöglichen Eigenschaften zu finden) und die Amplifikation.

Ausgezeichnete Übersichten und Buchkapitel, die sich mit den technischen Details der Selektionstechnik für künstliche kombinatorische Proteine befassen, sind verfügbar.^[99,100] Deshalb wird die Methodik an dieser Stelle nur knapp und in allgemeiner Form beschrieben. In den nach-

folgenden Abschnitten werden einige Aspekte des Proteingerüsts, der Bibliotheken und der Selektionstechniken erörtert.

3.2.1. Gerüstselektion sowie Bibliotheksentwurf und -konstruktion

Der erste Schritt bei einer Durchmusterung kombinatorischer Proteine besteht in der Auswahl der Peptidbibliothek. Diese Bibliotheken unterscheiden sich hinsichtlich des Gerüsts, der Peptidlänge, der Stringenz der Selektion und der Zahl selektierbarer Marker. Das Gerüst ist ein Proteinrahmenwerk, das abgeänderte Aminosäuren oder Inserate enthalten kann, die Proteinvarianten mit vollständig neuartigen Funktionen ergeben kann, im Allgemeinen eine neue Bindungsspezifität. Die Auswahl des Gerüstproteins hängt größtenteils von der beabsichtigten Verwendung der erzeugten Affinitätsliganden ab. Das Gerüst sollte jedoch vorzugsweise verhältnismäßig klein sein, das heißt, es sollte aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen und eine hochgradig stabile Architektur aufweisen.^[101] In der Literatur sind viele Proteingerüste beschrieben, und in den vergangenen Jahren sind einige Übersichten erschienen.^[3,4,101–104] Hier wird nur eine Auswahl solcher Gerüste vorgestellt (siehe Tabelle 2; dort wird auch der für das sich jeweils ergebende künstliche Protein gewählte Name angegeben), erschöpfende Beschreibungen finden sich an anderer Stelle.^[3,4,101–104]

Das Gerüst des *E.-coli*-Proteins TrxA ist weiträumig für die Entwicklung von Peptidaptameren herangezogen worden.^[91] TrxA ist ein robustes Enzym mit einer kurzen, das aktive Zentrum bildenden Schlaufe^[105] von relativ geringer Größe (ungefähr 12 kDa) und von guter Stabilität und Löslichkeit. Seine dreidimensionale Struktur ist gut bekannt. Da das Gerüst biologisch inert sein sollte, gilt für das TrxA-Gerüst, dass Peptide in die Schlaufe innerhalb des biologisch aktiven Zentrums des Moleküls eingeführt werden; dabei geht die katalytische Aktivität verloren. Jüngst ist ein als STM

(Stefin-A-Tripelmutante) bezeichnetes Proteingerüst entwickelt worden, das sich von dem intrazellulären Proteaseinhibitor Stefin A ableitet.^[106] STM verfügt über drei Stellen, die in der Primärstruktur des Proteins voneinander entfernt liegen, aber im gefalteten Protein benachbart sind, und die das Stefin A natürlicherweise nutzt, um Zielproteine zu binden.^[106] Darüber hinaus ist das STM-Gerüst so umgestaltet worden, dass verminderte Wechselwirkungen zwischen Humanproteinen und dem Gerüst resultieren, was in Bioassays die Kreuzreaktivität herabsetzt. Das STM-Gerüst ist noch weiter mutiert worden, um einen einzelnen Cysteinrest (STMcys+) einzuführen, der die gerichtete Anknüpfung des Gerüsts an eine feste Oberfläche mithilfe exponierter Sulfhydrylgruppen ermöglicht. Über andere STM-Varianten wurde jüngst berichtet.^[107] Millers Gruppe hat ein neues, ligandenreguliertes Peptidsystem (LiRP) konstruiert, bei dem die Bindungsaktivität der intrazellulären Peptide durch ein zellgängiges niedermolekulares Agens wie Rapamycin gesteuert wird.^[108] Andere Beispiele für Gerüste sind modellierte Anticaline auf der Grundlage von Lipocalinstrukturen,^[109] Trinectine, die sich von einer Fibronectin-III-Domäne herleiten,^[110] das grün fluoreszierende Protein (GFP),^[111] ein katalytisch inaktives Derivat der Staphylokokkennuclease (SNase),^[112] das Ankyrinwiederholungsprotein^[113] sowie „Affibody-Moleküle“, die durch Umgestaltung der B-Domäne des *Staphylococcus-aureus*-Proteins A entstanden sind.^[114] Diese B-Domäne ist ein relativ kurzes cysteinfreies Peptid von 58 Aminosäuren, das zu einer Drei-Helix-Bündelstruktur gefaltet ist, und das zu einer Variante umgestaltet wurde, die als Z-Domäne bezeichnet wird.^[96] Die Z-Domäne hat ihre Affinität für den Fc-Teil des Antikörpers beibehalten, während die schwächere Affinität für die Fab-Region praktisch vollständig verloren ging.^[115–117] Cysteinoknoten-Mikroproteine (die auch „Knottine“ genannt werden) sind andere interessante molekulare Gerüste für den Einbau fremder Peptidsequenzen,^[118–120] wohingegen

die Kunitz-Domäne ein Beispiel für einen natürlichen Serinproteaseinhibitor ist, der erfolgreich als Gerüst verwendet wurde.^[121]

Nach der Auswahl des Gerüsts werden die kombinatorischen Bibliotheken des Gerüsts erzeugt. Dies geschieht auf der DNA-Ebene durch Randomisierung der Codons geeigneter Aminosäurepositionen. Die Methode zur Konstruktion einer Proteinbibliothek besteht also aus der Konstruktion einer Bibliothek aus Nucleinsäuremolekülen (Genbibliothek), aus der durch Translation eine Proteinbibliothek gewonnen werden kann. Für die Erzeugung von Genbibliotheken steht heute ein breites Spektrum an Techniken zur Verfügung,^[122] aber ihre Darlegung würde den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen. In Abbildung 4 wird ein Beispiel für die

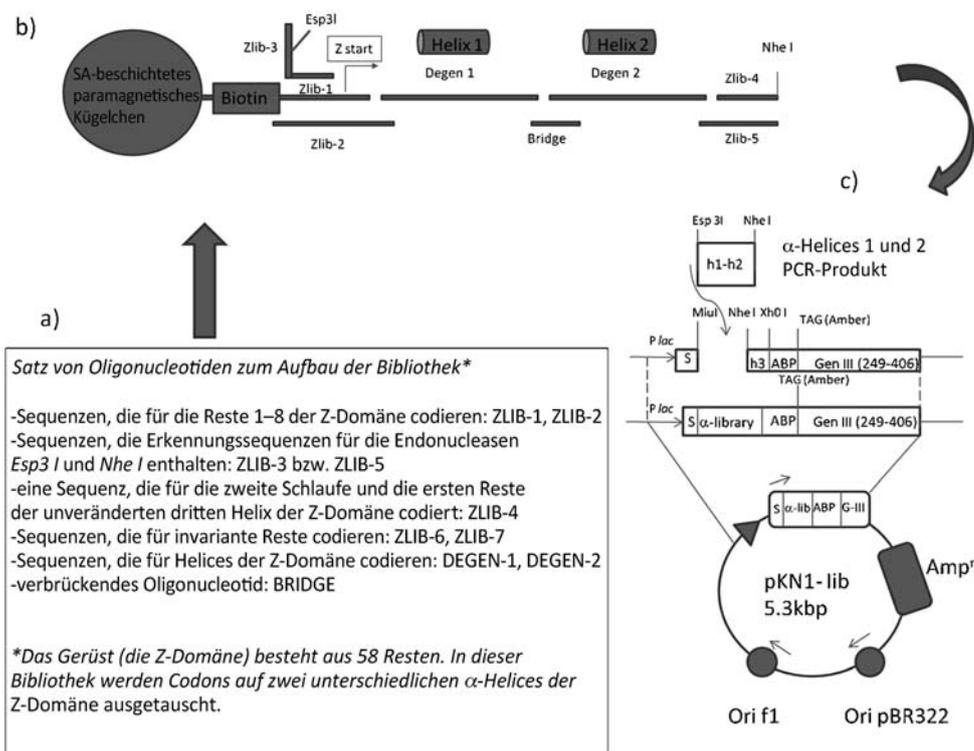


Abbildung 4. Aufbau einer Bibliothek (nach Lit. [8]): a) Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide. b) Die Bibliothek wurde mithilfe Streptavidin-überzogener paramagnetischer Kügelchen als Festphasenanker aufgebaut. Die festphasenunterstützte Zusammenlagerung wurde durch die Bindung des 5'-biotinylierten Oligonucleotidpaars ZLIB-1/ZLIB-2 an die Kügelchen ausgelöst. Nach dem Waschen wurde das vorbereitete Konstrukt DEGEN-1/BRIDGE/DEGEN-2 den Kügelchen zugesetzt und die Ligation durchgeführt. Der Zusammenbau wurde durch Hinzufügen und Ligation der prähybridisierten Oligonucleotide ZLIB-4/ZLIB-5 abgeschlossen. Vor der Amplifikation durch PCR wurden die Oligonucleotide ZLIB-2, BRIDGE und ZLIB-5 mit Alkali eluiert. Die Oligonucleotide ZLIB-3 und ZLIB-5 wurden als Primer für die Amplifikation per PCR eingesetzt. Um Doppelstrang-DNA für die Klonierung zu erhalten, wurden die zusammengesetzten und an den Kügelchen immobilisierten Einzelstrang-Genbibliotheken, die die beiden abgewandelten Helices der Z-Domäne codieren, als Matrize für die Amplifikation per PCR eingesetzt. c) Das die Bibliothek repräsentierende PCR-Produkt, das die abgewandelten Helices 1 und 2 codiert, wurde in den Phagemidvektor pKN1, der das Gen für die Reste 44–58 der Wildtyp-Z-Domäne (im wesentlichen Helix 3) enthält, gefolgt von dem Gen für eine 46 Reste umfassende Serumalbumin-Bindungsregion (ABP), die sich vom Streptokokkenprotein G ableitet, und das unter Erhaltung des Leser Rahmens mit der verkürzten Version des Hüllprotein-III-Gens des Phagen M13 verknüpft ist, subkloniert. Der Vektor pKN1 wurde wie folgt in mehreren Schritten aufgebaut: Ein Doppelstranglinker, der die invarianten Reste 44–58 der Z-Domäne codiert, wurde aus den Oligonucleotiden ZLIB6 und ZLIB7 gebildet. Er wurde als MluI-XhoI-Fragment in das Phagemid pKP986 inseriert, was pKN ergab. Das Phagemid PK986 codiert das *E.-coli*-OmpA-(S)-Führerpeptid, dem die Reste 249–406 des Hüllproteins III des filamentösen Phagen M13 unter Kontrolle durch den *lac*-Promotor von *E. coli* folgen.

Konstruktion einer kombinatorischen Bibliothek aus der α -helikalen Z-Domäne des Proteins A beschrieben (nach Lit. [8]). Es ist offenkundig, dass die kombinatorischen Bibliotheken der Gerüste an das Selektionssystem angepasst werden müssen, das eingesetzt werden soll (siehe Abbildung 4). Das bedeutet, dass kombinatorische Bibliotheken die Form von Hefe-Zwei-Hybridbibliotheken und von Phagendisplaybibliotheken usw. annehmen. Heutzutage können Bibliotheken von verschiedenen Firmen bezogen werden, insbesondere von Clontech (für die Hefe-Zwei-Hybridselektion, www.clontech.com), Invitrogen („FLITRX-Peptidbibliothek“) und anderen (siehe Tabelle 2).

3.2.2. Selektionstechniken

In der Literatur finden sich verschiedene Selektionstechniken beschrieben, deren Einsatz streng von der beabsichtigten Verwendung der kombinatorischen Proteine abhängt. In aller Kürze können diese Methoden als Nichtdisplayssysteme, zellabhängige Displayssysteme und zellfreie Displayssysteme klassifiziert werden.^[97] Bei Nichtdisplayssystemen wird das Zielprotein mit den einzelnen Bibliothekskomponenten *in vivo* exprimiert, und die Selektion hängt somit nicht von einem verfügbaren Zielprotein ab; das Zielprotein wird vielmehr in einer korrekt gefalteten Form vom Wirtorganismus exprimiert. *In-vivo*-Techniken stützen sich daher für gewöhnlich auf die Rekonstitution einer Proteinaktivität bei Bindungspartner-Ziel-Wechselwirkung (zum Beispiel Enzymaktivität, Fluoreszenz oder Transkriptionsaktivität). Das in Hefezellen verwendete Hefe-Zwei-Hybridssystem (Y2H) ist ein Beispiel einer *In-vivo*-Technik.^[123]

Bei dieser Durchmusterungsmethode wird ein Zielprotein mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne (BD) verknüpft und als „Köderkonstrukt“ in einem Hefestamm zur Expression gebracht. Begleitend dazu wird eine Bibliothek unterschiedlicher Peptide, die mit einer heterologen Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) verknüpft sind, als „Beutekonstrukte“ zur Expression gebracht (Abbildung 5a).

Wenn ein Peptid an das Zielprotein bindet, bildet sich ein Transkriptionsfaktor, bei dem die BD-Domäne und die Aktivierungsdomäne (AD) durch die wechselwirkenden Proteine miteinander verbrückt sind. Dieser Transkriptionsfaktor ist dann in der Lage, den Promotor eines Markergens zu aktivieren, das durch einen kolorimetrischen Enzymtest oder durch eine Wachstumsfähigkeitsselektion identifizierbar ist. Diese Durchmusterungsprozedur führt zu einem unmittelbaren Zugang zu den bindenden Molekülen in praktisch unbegrenzten Mengen. Der Vektor, der das bindende Molekül codiert, kann aus den Zellen des Hefestamms isoliert und die DNA-Sequenz des Inserats leicht ermittelt werden. Dieses Inserat kann dann in geeignete Expressionsvektoren eingebracht werden, um die bindenden Moleküle in Bakterien oder eukaryontischen Expressionssystemen zu synthetisieren.

Der Proteinfragment-Komplementationstest (PCA) oder die Säugetierzelldurchmusterung sind weitere Beispiele für *In-vivo*-Nichtdisplaytechniken. Der PCA beruht auf dem Prinzip, dass das Überleben von Zellen, die gleichzeitig komplementäre Fragmente des Enzyms Maus-Dihydrofolat-

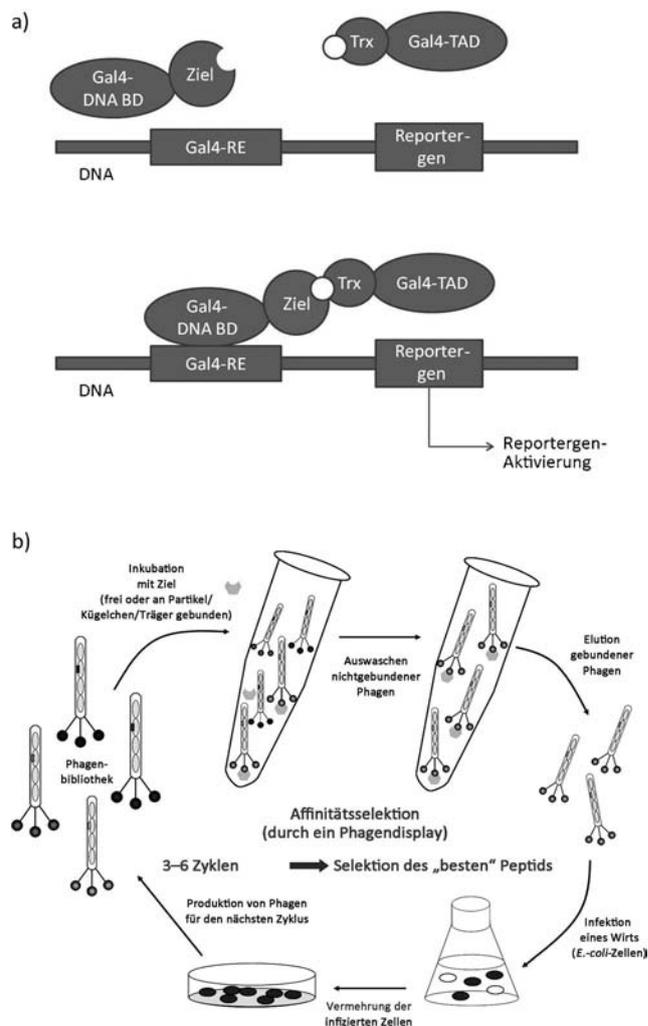


Abbildung 5. Selektionssysteme: a) Beim Hefe-Zwei-Hybrid-System ist der Transkriptionsfaktor Ga4p der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in eine DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) gespalten. Das Zielprotein wird mit der DBD fusioniert, das Peptid in ein Gerüst inseriert und mit der TAD fusioniert. Auf die Wechselwirkung des Zielpeptids hin bindet der Transkriptionsfaktor an das GAL4-RE und aktiviert die Transkription eines Reporter-gens. Alternativ kann eine zweite Variante, die sich auf das bakterielle LexA-Protein stützt, verwendet werden (nicht gezeigt). b) Die Phagendisplay-Biodurchmusterungsmethode ist ein *In-vitro*-System, bei dem sich das exprimierte rekombinante Zielprotein auf einer festen Unterlage befindet und mit Phagen inkubiert wird, die an ihren Oberflächenproteinen Zufallspeptide ausstellen. Das „Ziel“ bindende Phagen werden amplifiziert und in sukzessiven Runden positiver Selektion mehrfach durchmusterung.

reduktase (mDHFR) exprimieren, von der korrekten Faltung und Wechselwirkung dieser Fragmente abhängt.^[124]

Der Phagendisplay ist eine zellabhängige *In-vitro*-Displaytechnik, die 1985 von G. Smith erfunden wurde.^[125] Beim Phagendisplay werden die Peptid- oder Proteinbibliotheken mit den Hüllproteinen von Phagen (zumeist des GenIII-Proteins) fusioniert, die sich an der Oberfläche der Phagenpartikel befinden (Abbildung 5b). Die Phagen werden dann mit dem Zielmolekül inkubiert. Nach der Selektion werden nichtgebundene Phagen fortgewaschen, und spezifisch an das

Zielmolekül gebundene Phagen werden hernach eluiert. Die eluierten Phagen werden dann verwendet, um neue *E.-coli*-Zellen zu infizieren und dadurch die selektierten Klone zu amplifizieren. Diese neue Phagenbibliothek kann dann in einer neuen Selektionsrunde verwendet werden. Varianten dieses klassischen Phagendisplays sind der Phagemiddisplay^[124] oder der bakterielle Oberflächendisplay.^[126–128] Beispiele für zellfreie In-vitro-Displaytechniken sind der Ribosomendisplay^[113,129] und der mRNA-Display.^[129] Welche Selektionstechnik am besten für eine bestimmte Bindungsproteinbibliothek geeignet ist, hängt von verschiedenen Parametern ab: von der Diversität der Bibliothek, den Eigenschaften des Gerüsts oder den beabsichtigten Anwendungen.^[113]

Einmal selektiert, werden die kombinatorischen Proteine mit verschiedenen anderen Methoden aufgereinigt.^[124]

4. Die Anwendung von Nucleinsäureaptameren

Das enorme Potenzial von Aptameren als Therapeutika ist ausgiebig untersucht worden, bis schließlich im Jahr 2004 die US-amerikanische Food and Drug Administration das Eyetech/Pfizer-Aptamer Macugen für die Behandlung der altersbedingten exsudativen Maculadegeneration und des diabetischen Maculaödems zugelassen hat.^[130–134]

Ohne jeden Zweifel war der potenzielle Einsatz von Aptameren als Therapeutika, für den Wirkstofftransport und für die In-vivo-Diagnostik die treibende Kraft für die Forschungen an diesen Molekülen.^[135–152] Ein weiteres bedeutendes Anwendungsfeld für Aptamere ist jedoch die Verwendung als Biorezeptoren in Bioassays, wie die zunehmende Zahl von Publikationen zu diesem Thema vor Augen führt.^[153–161] Auf Aptameren beruhende Bioassays können in einer Vielzahl von Formaten realisiert werden (direkt, „Sandwich“ oder kompetitiv). Die Hauptunterschiede der verschiedenen Formate bestehen in der Natur der immobilisierten „Spezies“ (Aptamer, Antikörper oder zu analysierendes Ziel), der Zahl der experimentellen Schritte und in der Reihenfolge, in der die verschiedenen Reagentien mit dem festen Träger zusammengebracht werden, sofern dies vorliegt. Die Auswahl des Formats hängt von der Molekülgröße der Analysesubstanz, der Verfügbarkeit von Reagentien und den Kosten ab. Wenn es möglich ist, die verschiedenen Assay-Formate für die Detektion desselben Zielanalytikons in Anwendung zu bringen, erscheint es nützlich, die analytische Leistungsfähigkeit jeder Variante zu ermitteln und mit anderen zu vergleichen, um schließlich den Ansatz auszuwählen, der hinsichtlich der Nachweisgrenze, der Spezifität, der für die Analyse notwendigen Zeit und der Kosten den besten Kompromiss darstellt.^[162,163]

Ungeachtet der großen Zahl selektierter Aptamere für viele verschiedene Moleküle, ergibt eine Durchsicht der Literatur zu aptamergestützten Assays, dass nur einige bestimmte Aptamere zum Einsatz gekommen sind, und dass somit die Anwendung der Assays limitiert geblieben ist. Dies führt uns vor Augen, dass die vorgeschlagenen Ansätze vielfach nicht auf alle verfügbaren Aptamere verallgemeinert werden können, sondern vielmehr in strenger Beziehung zur

Sequenz und zur Struktur des Aptamers stehen. Tatsächlich findet sich unter den Hunderten (> 900) von Publikationen über aptamergestützte Assays, Sensoren oder Biosensoren der letzten zehn Jahre ein Anteil von fast 60%, der von nur acht Aptameren beherrscht wird (siehe Abbildung 6). Das

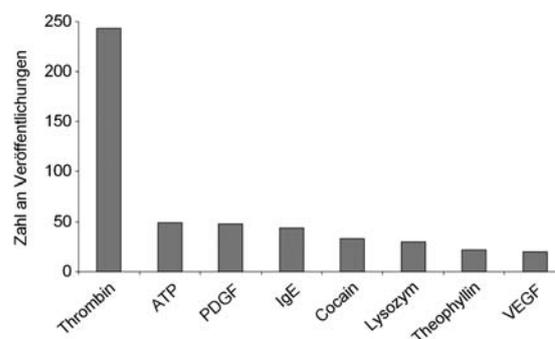


Abbildung 6. Die in Veröffentlichungen über Biosensoren am häufigsten verwendeten Aptamere.

Thrombin-Aptamer stellt davon den größten Anteil; dieser Punkt wurde von Baird^[164] eingehend erörtert, der es als „das Thrombinproblem“ kennzeichnete. In derselben Abhandlung schrieb Baird, dass „Aptamere in einem gewissen Sinne die Opfer ihres eigenen Erfolgs“ geworden seien: Tatsächlich zeigt der Umstand, dass nur einige wenige der selektierten Aptamere gegenwärtig bei der Entwicklung von Bioassays in Gebrauch sind, dass es leichter und gewinnbringender ist, bereits gut bekannte Aptamere zu verändern als andere Aptamere, die auf klinisch relevantere Proteine zielen, bis zum Punkt der vollständigen Validierung für die analytische Anwendung zu bringen. Der Eindruck ist, dass die Forscher bei der Selektion von Aptameren großartige Arbeit geleistet haben. Dies gilt in gleichem Maße dafür, dass sie den Selektionsprozess immer schneller, sowie leicht und weithin anwendbar gestaltet haben: Es scheint nunmehr an der Zeit zu sein, dass die Entwickler von Testsystemen (Assays) aufzeigen, dass Aptamere Antikörper im klinischen Laboratorium ersetzen oder diese zumindest ergänzen können. Wir meinen, dass eines der Probleme in dem Fehlen leichter und universeller Regeln für die Verwendung von Aptameren in Bioassays besteht; Regeln, die heutzutage für das Arbeiten mit Antikörpern gut etabliert sind. Die Hauptschwierigkeit bei der Entwicklung aptamergestützter Assays ist vor diesem Hintergrund die Notwendigkeit einer systematischen Studie zu den Bindungsbedingungen von Aptameren, ihren Strukturen und ihrem Verhalten. Darüber hinaus ist die Übertragung optimierter Parameter von einem Aptamer auf ein anderes manchmal unmöglich.

In den nachfolgenden Abschnitten werden mehrere Beispiele für aptamergestützte Assays vorgestellt: Die Idee bestand darin, eine Übersicht über die Arbeiten zu geben, die sich aus dem Einsatz von Aptameren entwickelt haben. Dabei werden in der Hauptsache Arbeiten einbezogen, die sich auf andere als das Thrombin-Aptamer stützen. Die Veröffentlichungen werden hinsichtlich des Assayformats (direkte, „Sandwich“- und kompetitive Assays), der Ausschöpfung der

unterschiedlichen Ansätze, sowie in manchen Fällen mit einer kritischen und systematischen Untersuchung des Aptamers und der Arbeitsbedingungen wiedergegeben und beleuchtet.

4.2.1. Aptamere in Einzelstellenassays (direkte Assays)

Die hohe Empfindlichkeit, die von aptamergestützten Assays für den Nachweis einiger Zielanalytika gefordert wird (z. B. pM-Konzentrationen), kann oftmals nicht durch ein direktes oder Einzelstellenformat erreicht werden, da die Affinitäten der Aptamere für diese Ziele nicht hoch genug ist (sie liegt im mikro- bis nanomolaren Bereich). Aus diesem Grund sind mehrere Strategien zur Signalamplifikation zum Einsatz gebracht worden, zum Beispiel metallische und magnetische Nanoteilchen, Enzymmarkierungen und Quantenpunkte.^[153,165]

Mit Aptameren funktionalisierte metallische und magnetische Nanoteilchen sind verbreitet für die direkte Detektion von Proteinen und anderen Molekülen eingesetzt worden.^[166-170] Für das direkte Assay-Format sind auch verschiedene Strategien zur kolorimetrischen Erfassung über Aptamere und Goldnanoteilchen entwickelt worden. Der Hauptvorteil der auf Aptamer-Goldnanoteilchen (AuNP) fußenden kolorimetrischen Testsysteme besteht darin, dass molekulare Erkennungswechselwirkungen in Farbumschläge übersetzt werden können, die durch Absorptionsspektroskopie oder Beobachtung mit dem bloßen Auge verfolgt werden können; es sind daher keine ausgefeilten Apparate erforderlich. Auf der Grundlage dieser Strategie ist eine Methode für die Zielerfassung durch ein Aptamer, das bei einer vorgewählten Salzkonzentration an ein kurzes komplementäres Oligonucleotid mit AuNP-Markierung bindet, vorgestellt worden.^[171] Die Oberflächenladungsdichte der AuNPs ließ sich ebenfalls durch Änderungen der Aptamerkonformation über Faltung und Entfaltung auf den AuNP-Oberflächen kontrollieren. Dabei waren mit gefalteten Aptameren modifizierte AuNPs stabiler gegenüber einer salzinduzierten Aggregation als solche, die an ungefalteten Aptameren verknüpft waren. Auf diese Tatsache und auf die vorhersagbare Strukturumschaltung des Aptamers aufbauend, konnte die Analyse von Adenosin erfolgreich durchgeführt werden.^[172]

In ähnlicher Weise wie die Gold- und die Magnetnanoteilchen sind Quantenpunkte (QDs) zum Zweck der „Erkennung“ von Proteinen an Aptamere angekoppelt worden.^[169,173,174]

Andere zum Zweck der Signalerzeugung oder -amplifikation eingesetzte Nanomaterialien wie Kohlenstoffnanoröhren (CNTs) sind in Verbindung mit Aptameren eingesetzt worden.^[169,175,176] Die photophysikalische Eigenschaft einwandiger Nanoröhren (SWNTs), die Lumineszenz von Farbstoffen zu löschen, kam bei der Entwicklung eines Sensors mit Thrombinaptameren zum Einsatz.^[177] Das gleiche Prinzip ist kürzlich für die Entwicklung eines Testsystems zum Nachweis von ATP durch nichtkovalente Zusammenlagerung farbstoffmarkierter ATP-Aptamere und SWNTs eingesetzt worden.^[178]

Darüber hinaus ist berichtet worden, dass Aptamere in CNT-Feldeffekttransistor-Sensoren (FET-Sensoren) sehr viel

effizienter arbeiten als Antikörper.^[179] In noch jüngerer Zeit hat dieselbe Arbeitsgruppe einen markierungsfreien Sensor für die Immunglobulin-E-Detektion (IgE-Nachweis) vorgestellt, der Kohlenstoffnanoröhren-Feldeffekttransistoren (CNTFETs) nutzt und im Konzentrationsbereich 250 pM bis 160 nM arbeitet.^[180] Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die vorgeschlagene Methode eine bessere Nachweisgrenze hat als andere Methoden, die sich auf Aptamer-IgE-Wechselwirkungen stützen.

Das Faktum, dass einige Aptamere sich bei Assoziation mit ihren molekularen Zielen falten oder ihre Konformation ändern, kann zum Entwurf neuer aptamergestützter Assays des direkten Formats genutzt werden kann.

Verschiedene Assays – insbesondere elektrochemische Sensoren – die auf diesem Ansatz beruhen, sind für die Detektion unterschiedlicher Ziele wie Theophyllin,^[181,182] Lysozym,^[183] Botulinus-Neurotoxin,^[184] Adenosin,^[185,186] Cocain^[187,188] oder Thrombin^[189,190] eingesetzt worden. Beim elektrochemischen Ansatz kann die Wechselwirkung eines markierten Aptamers mit seinem Ziel die Entfernung der elektroaktiven Markierung zur Sensorelektrode modulieren und so den Redoxstrom verändern.

Ungeachtet der großen Zahl publizierter Assays, die sich auf diesen Ansatz stützen, verfügen die meisten der selektierten Aptamere über eine wohlgeordnete Faltung und gehen bei der Bindung der Zielstruktur keine signifikante Konformationsänderung ein, wie Plaxco und Mitarbeiter kürzlich dargelegt haben.^[191,192] Wenn eine Konformationsänderung nicht oder nur partiell auftritt und so zu keinem Signalereignis führt, ist allgemein eine Änderung der Aptamergeometrie durch die Einführung eines Antisense-Oligonucleotids notwendig, das mit dem Aptamer hybridisieren kann und es in Abwesenheit des Ziels im ungefalteten Zustand hält,^[193] alternativ kann dies auch durch Destabilisierung der nativen Aptamerfaltung durch Verstümmelung oder die Einführung von Punktmutationen in das Molekül erreicht werden.^[194] Diese Ansätze zur Aptamermodifizierung sind systematisch untersucht und anhand zweier repräsentativer Aptamere (ATP- und IgE-Aptamer) verglichen worden. Dabei wurde beobachtet, dass die relative Änderung des Signals bei Bindung des Ziels bei den verschiedenen untersuchten Konstrukten um mehr als zwei Zehnerpotenzen schwankt, und dass die optimale Geometrie spezifisch für die Aptamersequenz ist, auf die der Sensor aufbaut.^[192] Eine alternative mögliche Abänderung der Aptamergeometrie ist jüngst vorgeschlagen worden, die sich der Aufspaltung des Aptamers in zwei geeignete Segmente bedient.^[195] Das gleiche Prinzip – als Bildung supramolekularer Aptamerkomplexe definiert (Abbildung 7) – ist kürzlich für den Nachweis von Cocain durch verschiedene Forschergruppen herangezogen worden; dabei kamen elektrochemische (Voltammetrie, Impedanz- und ionenselektive Feldeffekttransistoren (ISFET)), photochemische und SPR-Techniken zum Einsatz.^[196-199] Die Nachweisgrenzen der verschiedenen Konfigurationen liegen bei 1×10^{-6} – 1×10^{-5} M^[196-198] oder darunter (0.1 μ M).^[199]

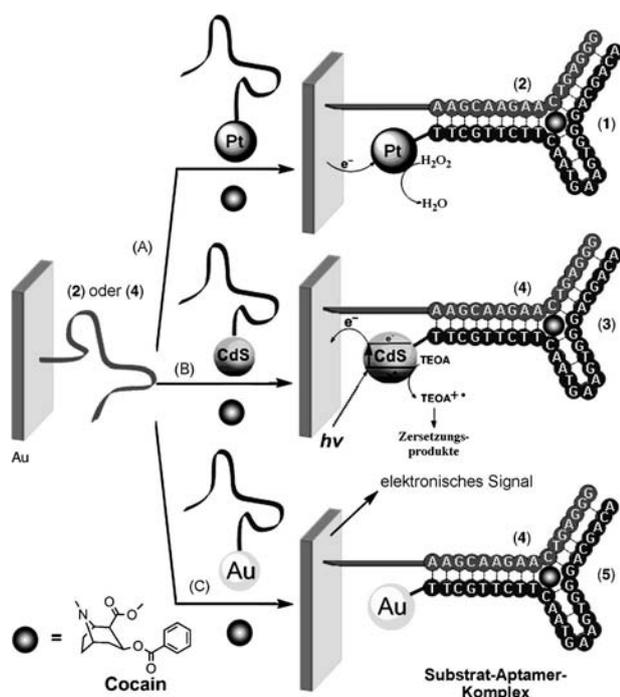


Abbildung 7. Elektrochemische (A), photoelektrochemische (B) und SPR-Detektion (C) von Cocain über Selbstorganisation supramolekularer Komplexe von mit Platinanoteilchen, CDS-Nanoteilchen oder Goldnanoteilchen funktionalisierten Cocain-Aptameruntereinheiten, und mit der zweiten Cocain-Aptameruntereinheit funktionalisierte Goldoberflächen in Gegenwart von Cocain. Wiedergabe nach Lit. [196].

4.2.2. Aptamere in Doppelstellenassays (Sandwich-Assays)

Der Einsatz des Sandwich-Formats ermöglicht die Detektion des Zielanalytikons mit sehr hoher Empfindlichkeit und Selektivität. Zwei Bedingungen müssen hierfür erfüllt sein: 1) Das Analytikon verfügt über zwei Epitope, die so verschieden sind, dass beide Rezeptoren an es binden können, ohne dass die Bindung des einen die Bindung des anderen beeinflusst; 2) es werden zwei Aptamere gegen ein derartiges Analytikon selektiert. Der Hauptnachteil dieses Formats besteht darin, dass nur sehr wenige Moleküle (Thrombin und PDGF) zwei Aptamere haben, die an unterschiedliche Stellen binden, und dass nicht alle Moleküle über zwei Bindungsstellen verfügen. Um dieses Problem zu lösen, haben zahlreiche Autoren aptamer-gestützte Assays entwickelt, indem sie für das „Sandwich“ entweder das gleiche Aptamer als Primär- und Sekundärliganden einsetzen^[200,201] oder ein Aptamer und einen Antikörper als Liganden für das Sandwich verwenden.^[202–205] Der Sandwich-Ansatz, der sich auf die Verwendung zweier unterschiedlicher Aptamere stützt, ist in der Hauptsache nur für Thrombin berichtet worden, wo die Elektrochemolumineszenz,^[206] magnetische Kügelchen und Quantenpunkte^[207] oder magnetische Kügelchen in einem elektrochemischen Assay^[208] zum Einsatz kamen. Der Sandwich-Assay wurde außerdem auf mikrofluidischen Einwegsystemen durchgeführt, die auf doppelseitigem Klebeband und polymeren Werkstoffen mithilfe eines Laserschneidverfahrens hergestellt wurden.^[207] In dieser Studie wurde eine Nachweisgrenze von 10 ng mL^{-1} mit einem

linearen Bereich von $100\text{--}1000 \text{ ng mL}^{-1}$ mit einer mittleren Standardabweichung von 8 % erreicht.

4.2.3. Aptamere in kompetitiven Assays

Die Vorteile eines kompetitiven Formats liegen vorrangig in der Tatsache begründet, dass nur ein Aptamer erforderlich ist (für viele Zielanalytika wurden zwei oder mehr Aptamere gar nicht selektiert), sowie darin, dass der Zeitaufwand für den Assay geringer ist. Beispielsweise ist ein kompetitiver elektrochemischer Einwegtest für den Nachweis von IgE beschrieben worden.^[209] Hierbei wurde das IgE-Antigen auf der Oberfläche von auf einen Schirm gedruckten Elektroden immobilisiert, danach wurde ein Wettbewerbsschritt zwischen dem an die Elektrodenoberflächen gebundenen IgE und in Lösung befindlichem IgE um das biotinylierte Aptamer durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei $(23 \pm 4) \text{ ng mL}^{-1}$ und die RSD bei 5.7 ± 0.8 . Bei weiteren Arbeiten wurde die Impedanzspektroskopie (Faradaysche Impedanzspektroskopie, FIS) als Transduktionstechnik eines aptamer-gestützten kompetitiven Assays zum Nachweis von Neomycin B eingesetzt.^[210] Das Interessante an dieser Arbeit ist die Möglichkeit, niedermolekulare Substanzen wie Neomycin B als Alternative zu einem zeitaufwendigen Immunassay oder der HPLC mit einem elektrochemischen aptamer-gestützten Assay leicht nachweisen zu können. Ein ähnlicher Ansatz wurde bei der Entwicklung eines optischen Sensors für das gleiche Molekül – Neomycin B – verfolgt; hierbei kam die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zum Einsatz.^[211]

5. Anwendungen von Peptidaptameren

Die medizinische Therapie und die In-vivo-Diagnostik sind bedeutende Anwendungsfelder für Peptidaptamere.^[4,96,105,212–219] Diverse künstliche kombinatorische Proteine befinden sich bislang in präklinischen Studien, und einige wenige davon sind in der klinischen Erprobung.^[4] Theoretisch sind die verschiedenen künstlichen kombinatorischen Proteine sämtlich als Biorezeptoren in Bioassays verwendbar – vorausgesetzt, sie sind in der Lage, das spezielle Zielmoleküle mit hinreichender Affinität und Selektivität zu binden. Bis jetzt haben sich nur wenige Studien auf den tatsächlichen Einsatz mit diesem Ziel konzentriert.^[101] Im Vergleich zu dem, was sich auf dem Gebiet der Nucleinsäureaptamere ereignet, sind die Veröffentlichungen über analytische Anwendungen stark in der Unterzahl, und sie befassen sich vorrangig mit medizinisch-diagnostischen Anwendungen. Soweit wir wissen, wurden umweltchemische Anwendungen dieser kombinatorischen Affinitätsproteine als Nagelprobe für das Konzept vorgeschlagen, aber bis jetzt noch nicht umgesetzt: zum Beispiel die Möglichkeit, Anticaline für die direkte Detektion niedermolekularer Verbindungen wie unsymmetrisch substituierter Phthalsäureester einzusetzen.^[101]

Im Hinblick auf diagnostische Anwendungen werden in der Literatur verschiedene Studien vorgeschlagen. Diese werden auf der Grundlage des verwendeten Gerüsts kritisch beleuchtet. Davis et al. verwendeten Peptidaptamere auf der Grundlage eines STM-Gerüsts,^[220] um einen SPR-Assay mit

einer Nachweisgrenze von 1 nM (150 ng mL^{-1}) aufzubauen, und konnten die Affinitätskonstante der Wechselwirkung von STM mit einem zugehörigen Antikörper zu $K_D = (1.47 \pm 0.23) \text{ nM}$ bestimmen. Die Autoren konnten zeigen, dass ein mutiertes STM-Gerüst mit einem einzelnen eingefügten Cysteinrest (STM^{Cys+}; Abbildung 8a) die direkte Immobilisie-

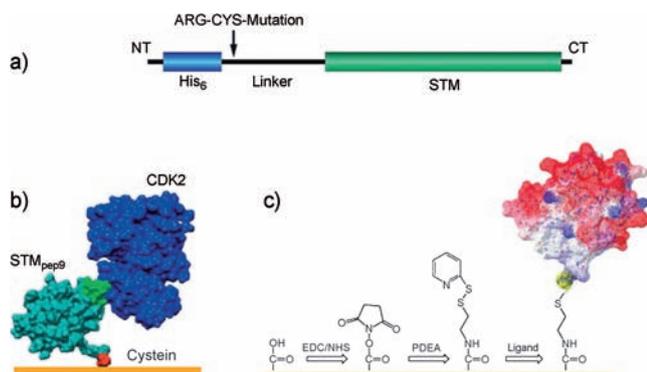


Abbildung 8. Beispiele für Immobilisierungsprozeduren mit cystein-modifiziertem STM (STM_{pep9}^{Cys+}) als Aptamer: a) Schemazeichnung des His₆-Cys-STM-Fusionsproteins, die die Lage des zusätzlich eingeführten Cysteinrests am Aminoterminus von STM anzeigt (nach Lit. [221]); b) Schemazeichnung des über eine S-Au-Bindung an einer Oberfläche immobilisierten ausgerichteten STM_{pep9}^{Cys+}-CDK2-Komplexes;^[223] c) Oberflächenaktivierung nach dem PDEA-Protokoll.^[222] In diesem Fall wurde die Goldoberfläche mit einer gemischten selbstorganisierten Monoschicht aus (1-Mercapto-11-undecyl)tri(ethylenglycol) und HS(CH₂)₁₀(OCH₂CH₂)₃OCH₂COOH (100:1) präaktiviert.

rung auf Goldoberflächen über eine S-Au-Bindung ermöglicht (Abbildung 8b). Die gleichen Autoren^[221] legten eine Erweiterung dieser Arbeit vor, die sich Peptidaptamere für den Nachweis cyclinabhängiger Proteinkinasen (CDKs) bediente. Die Immobilisierungsprozedur wurde durch den Einsatz homodifunktionaler Maleimid-Vernetzer für die Konjugation von Cysteinylresten und Sulfhydrylgruppen, die auf einer thiofunktionalisierten Oberfläche exponiert lagen, optimiert.

Jüngst beschrieb dieselbe Gruppe^[222] eine weitere Immobilisierungsprozedur, um auf einer Oberfläche ausgerichtete Peptidaptamere zu erhalten, sowie deren Einsatz in einem hochspezifischen SPR-gestützten Nachweisprotokoll für die aktive Form der CDK2 mit Empfindlichkeit im unteren nanomolaren Bereich. Die Forscher optimierten insbesondere eine auf eine mit [2-(2-Pyridinyldithio)ethanamin] (PDEA) aktivierte Goldoberfläche (Abbildung 8c) gestützte Prozedur. Bedeutend war dabei, dass die selektierten Aptamere in der Lage waren, subtile Änderungen der Konformation der CDK2 zu erfassen, die mit der Aktivierung ihrer katalytischen Aktivität einhergehen. Eine typische Reaktion auf die inaktive Form der CDK2 lag im Bereich von 0.5–2% der Bindung der aktiven Form der CDK2 im Konzentrationsbereich von 2 bis 20 nM. Dies zeigte, dass eine Nicht-Antikörper-Proteinsonde in der Lage war, die aktive Isoform eines Proteins zu detektieren. Somit könnten sich Peptidaptamere als geeignet erweisen, das Repertoire an Sonden zu erweitern, um Proteinkonformationen, posttranslationale

Modifikationen (PTMs) oder durch PTMs stabilisierte Konformationen zu „erkennen“ und nachzuweisen.

Der potenzielle Einsatz dieser Gerüstproteine als Einfangsonden auf Arrays wurde ebenfalls beschrieben. Der von der Wälti-Gruppe vorgeschlagene Ansatz ist besonders interessant, weil dort markierungsfreie Detektionstechniken beschrieben werden.^[223] Die Autoren stellen eine auf Peptidaptamere beruhende Prozedur vor, die als künstliche Proteindetektoren auf Goldelektroden aufgereicht waren, im Zusammenhang mit elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS). Beschrieben wird eine Methode zur Immobilisierung spezifischer Peptidaptamere an individuellen Elektroden mit einem Maskierungs/Demaskierungsverfahren auf der Grundlage von Poly(ethylenglycol)₆-thiol mit Methyl-Endgruppen und STM^{Cys+} auf Goldelektroden. Die EIS wurde als markierungsfreie elektrochemische Methode eingesetzt, die lokale Schwankungen der Impedanz der elektrochemischen Grenzschicht über der Oberfläche der Goldelektrode erfasst. Das Einfangen von Proteinmolekülen durch eine aptamerfunktionalisierte Elektrode stört die elektrischen Eigenschaften der Schicht und somit ihre Impedanz. Die Autoren konnten die spezifische Erkennung von CDKs in Gesamtzell-Lysaten mit Anordnungen aus zehn Elektroden, die jeweils mit einem anderen Peptidaptamer funktionalisiert worden waren, nachweisen. Es gab keine messbare Signaleinstreuung unter den Elektroden. Die berichtete Empfindlichkeit der Methode lag im klinisch relevanten Bereich und vermag Proteine vor dem starken Hintergrund des Gesamtzell-Lysats zu detektieren. Estrela und Mitarbeiter^[224] berichten über ein anderes markierungsfreies Detektionsschema auf der Grundlage STM-gestützter Aptamer-Protein-Wechselwirkungen. Unter Verwendung einer akkuraten differentiellen Spannungsinstrumentierung gelang der Nachweis über eine direkte Messung von Schwankungen des Offenkreispotentials (OCP).

Affibody-Moleküle sind ebenfalls hinsichtlich ihrer Eignung als Affinitätssonden für das Protein-Mikroarray-Format untersucht worden. So wurden Affibody-Moleküle mit Affinitäten für IgA, IgE, IgG, TNF α , Insulin und Taq-Polymerase auf Thiodextra-Mikroarrayträgern immobilisiert, gefolgt von einer Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Analysesubstanzen. Dabei ergab sich eine spezifische Bindung des betreffenden Zielproteins ohne beobachtbare Kreuzreaktivität mit einer Nachweisgrenze von nur 70 fM im Fall der besten Affibody-Moleküle.^[96] Affibody-Moleküle wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Einfangagentien in einem Sandwich-Array mit unmarkiertem Zielprotein und monoklonalen Antikörpern für die Detektion evaluiert; es zeigte sich eine Spezifität in einer komplexen Serumprobe.^[96]

Friedman et al. entwickelten ein Affibody-Molekül, das in der Lage ist, gleichzeitig zwei verschiedene Zielanalytika zu binden; dies waren HER2 (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor-2) und EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor).^[225] Die simultane Bindung an zwei Zell-Linien, die die Rezeptoren exprimierten, wurde sowohl im Mikroarray-Format wie auch durch Echtzeitanalyse von Zell-Zell-Wechselwirkungen nachgewiesen.

Affibody-Moleküle sind zur Detektion von Analytika in Lösung auch mit einem resonanten Fluoreszenzenergie-

transfer (FRET) kombiniert worden. In Lit. [226] wird über die Produktion zweier verschiedener Affibody-Moleküle für IgA oder IgG durch Festphasensynthese berichtet, die die ortsspezifische Konjugation verschiedener Fluorochrome an entgegengesetzte Enden der Affibody-Moleküle ermöglichen soll. Die Zugabe von Zielproteinen zu den doppelt markierten Affibody-Molekülen führt zu einer konzentrationsabhängigen Verschiebung des Fluoreszenzquotienten, induziert durch das Binden des Zielproteins und die Verminderung im FRET zwischen dem Akzeptor und dem Donorfluorophor. In einer ähnlichen Studie derselben Gruppe^[227] kamen zwei verschiedene anti-idiotypische Affibody-Paare – bestehend aus einem idiotypischen Antiziel-Affibody-Molekül und einem anti-idiotypischen Affibody-Molekül, die um dieselbe Bindungsstelle am Zielprotein konkurrierten – zur Detektion des unmarkierten Zielproteins in Lösung zum Einsatz.

Xu et al.^[110] beschreiben die Detektion von TNF- α und Leptin mithilfe von Fibronectin III. Gerüstproteine wurden an festgelegte Positionen auf Glasobjektträgern durch spezifische Basenpaarung zwischen an die Oberfläche angehefteten Oligodesoxynucleotiden und komplementären DNA-Linkersequenzen von mRNA-Proteinfusionen immobilisiert, die unmittelbar aus dem Selektionsansatz hervorgingen. Unter Einsatz eines Sandwich-Detektionsformats (das sich Cy3-markierter monoklonaler Antibiotin-Antikörper bedient) konnte gezeigt werden, dass die beiden untersuchten Fibronectinvarianten ihre jeweiligen Positionen fanden und ihre Ziele selektiv banden.

Allgemein gesprochen, boten „Peptidaptamere“ aus mehreren, vorangehend beschriebenen Gründen eine verbesserte Selektivität bei Nachweisanwendungen, die im Prinzip aber auf ihrer spezifischen Bindung beruhen.^[110] Darüber hinaus sollte einem im Vergleich zu Antikörpern kleine Oberfläche des Gerüstreagens zu einem verminderten Signalhintergrund führen, der durch unspezifische Wechselwirkungen mit Bereichen entsteht, die nicht unmittelbar mit der Erkennung des Analytikons zusammenhängen.^[110] Bei Assay-Formaten, die eine Immobilisierung des ersten Affinitätsreagens für den Einfang des Analytikons beinhalten, kann die Verwendung eines solch kleinen Reagens im Prinzip zu einer höheren molaren Bedeckungsdichte (mehr Bindungsstellen pro Flächeneinheit) im Vergleich zu großen Antikörpern führen. Soweit wir wissen, erörtern nichtsdestoweniger nur wenige Veröffentlichungen das Verhalten dieser Moleküle in komplexen Matrices wie biologischen Flüssigkeiten, und eine detaillierte Evaluierung des Verhaltens des Großteils dieser Moleküle in realem Probenmaterial steht noch aus.

6. Gegenwärtige Herausforderungen und aktuelle Trends

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargelegt, dringen Aptamere (sowohl Nucleinsäuren als auch Peptide) nach und nach in das Gebiet klassischer Antikörperanwendungen vor. Dies wird durch die kommerzielle Verwertung einiger dieser Moleküle für verschiedene Anwendungen unterstrichen. Die medizinische Therapie und Diagnostik sind

noch immer das Hauptinteressens- und -einsatzgebiet. Andere biotechnologische Felder wenden sich jedoch auch dieser neuen Klasse von Reagentien zu.

Die Möglichkeit, Nucleinsäure- und Peptidaptamere als Biorezeptoren in Bioassays einzusetzen, wird durch die gewaltige Zahl an Publikationen demonstriert. Ein großer Teil dieser Studien berichtet allerdings nur über Analysen und Standardbedingungen; wesentliche Informationen hinsichtlich des Verhaltens in „realen“ Matrices fehlen noch. Nichtsdestoweniger gehen einige jüngere Untersuchungen in diese Richtung und zeigen, dass Aptamere erfolgreich an klinischem Probenmaterial eingesetzt werden können. Aus der Auswahl der übrigen heben wir die Veröffentlichungen von Gold et al.^[80] und von Ostroff et al. hervor,^[228] in denen SOMAmere für die Multiplexproteomik-Technik zur Biomarkersuche eingesetzt wurden. In Lit. [228] beschreiben die Autoren die Identifizierung von 44 Biomarkern durch Vergleich der Blutseren von starken Rauchern ohne bekanntes kleinzelliges Bronchialkarzinom mit Seren von Rauchern mit gutartigen Knoten und solchen von starken Rauchern mit bekanntem kleinzelligem Bronchialkarzinom in einem frühen oder späten Stadium. Die Daten für das Gesamtexperiment wurden anhand von Serumproben von 1326 Patienten (mit 870 Proteinmessungen pro Probe) gewonnen. Die Serumproben stammten aus vier unabhängigen Biopsie-Materialbanken. Erst 2011 berichteten Muller et al.^[229] über einen interessanten Assay für den Nachweis von Thrombin in Plasmaproben von 20 gesunden Blutspendern mit sorgsamster Kontrolle der präanalytischen Bedingungen. Tan und Mitarbeiter^[63,230] haben wiederum die Einsetzbarkeit von Aptameren als Biorezeptoren sowohl für die Extraktion wie für die Anreicherung von Tumorzellen aus Körperflüssigkeiten wie Blut oder Sputum, sowie zu deren Detektion aufgezeigt.

Ein weiterer entscheidender Aspekt für eine volle Anwendung in Bioassays ist die Anwendung an Umwelt- und Lebensmittelproben. Diesbezüglich werden einige Beispiele für Nucleinsäureaptamere erwähnt, nicht aber für „Peptidaptamere“. In Bezug auf die Peptide könnte der Einsatz von Gerüsten auf der Basis von GFP oder β -Lactamase, die von Natur aus eine definierte spektroskopische oder biochemische Aktivität aufweisen, in Bioassays besonders interessant sein, da sie durch eine integrierte Bindungs- und Reporterfunktion gekennzeichnet sind, was eine unmittelbare Quantifizierung der Analysenzielsubstanz durch Messung der Fluoreszenz oder der Enzymaktivität gestattet. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist diese Möglichkeit jedoch noch nicht voll ausgeschöpft. Die Herausforderungen zu erörtern, denen sich die Entwicklung der Aptamertechnik gegenüberstellt, sprengt den Rahmen dieses Aufsatzes, wir wollen dennoch darauf hinweisen, dass die Entwicklung von LNA-Aptameren (locked nucleic acid aptamers)^[231,232] und PNA-Aptameren (peptide–nucleic acid aptamers)^[233] dem Feld der Biosensorik durch Moleküle mit maximaler chemischer Diversität, minimaler Größe und großer Biostabilität nützlich sein kann. Ähnliche Überlegungen lassen sich für Peptidaptamere mit nichtnatürlichen Aminosäuren anstellen, die die Biostabilität erhöhen und neue Funktionalitäten und andere Eigenschaften mit sich bringen.^[234]

7. Zusammenfassung und Ausblick

Nucleinsäureaptameren und „Peptidaptameren“ ist ihr kombinatorisches Wesen gemeinsam. Dieses Faktum vergrößert die Aussicht, neue bindende Moleküle zu finden, stark. Ihre Stabilität und die hohe Ausbeute bei ihrer Herstellung, die nicht auf den Einsatz von Tieren angewiesen ist, sollten dabei behilflich sein, ihre Verwendung auf verschiedenen Gebieten der Wissenschaft zu fördern.

Während die Vorteile von Aptameren gegenüber Antikörpern auf der Hand liegen, ist es schwierig, Nucleinsäuren mit Proteinen zu vergleichen. Proteine verfügen über eine Vielzahl funktioneller Gruppen, die bei Nucleinsäuren nicht vorkommen, und die Wechselwirkungen und somit die Affinität für das Ziel verstärken können (zum Beispiel durch die Bildung von Wasserstoffbrücken oder elektrostatischen Bindungen). Proteine zeigen ein anderes Säure-Base-Verhalten als Nucleinsäuren. Das im Vergleich zu Nucleinsäuren starre Molekülgerüst der Proteine kann ebenfalls von Vorteil sein. Wie Wilson und Szostak über einen Vergleich von Enzymen und Ribozymen geschrieben haben:^[46] „Das aktive Zentrum eines Proteins kann etwa 8 Aminosäurepositionen aufweisen, die unmittelbar zur Substratbindung beitragen; daher beläuft sich die Anzahl möglicher Kombinationen von Seitenketten, auf die die Evolution zurückgreifen kann, auf 10^{10} ; das aktive Zentrum eines Ribozyms wäre dagegen hinsichtlich der Anzahl unterschiedlicher Kombinationen von Seitenketten und funktionellen Gruppen, die es in Anwendung bringen könnte, sehr viel eingeschränkter.“ Es ist offenkundig, dass sich diese Überlegung auf alle Klassen von Nucleinsäureaptameren im Vergleich zu Proteinen – einschließlich der Peptidaptamere – übertragen lässt. Nichtsdestotrotz ist ein Vergleich dieser beiden Klassen von Affinitätsmolekülen keine triviale Angelegenheit. Um diesen Vergleich anzustellen, muss man verschiedene Dinge im Gedächtnis behalten, wie etwa die Selektion und die Herstellungsverfahren, die zu unterschiedlichen Einschätzungen führen können.

Darüber hinaus dürfen wir, von einem analytischen Standpunkt aus betrachtet und ihren Einsatz als Reagentien in Bioassays in Betracht ziehend, das Wesen des Probenmaterials (das heißt, klinisches Probenmaterial oder Umweltmatrizes) nicht außer Acht lassen, weil auch dieser Punkt die Leistungsfähigkeit eines Moleküls stark beeinflussen kann. Es ist daher unmöglich, vorherzusagen, welches Affinitätsmolekül das für eine ordnungsgemäße Verwendung das am besten geeignete ist.

Es ist jedoch unsere Meinung, dass die Verfügbarkeit einer großen Auswahl an bindenden Molekülen wie Nucleinsäure- und Peptidaptameren, die sich in der chemischen Zusammensetzung unterscheiden und auf unterschiedlichem Wege hergestellt werden, gewaltige Vorteile für die Bioanalyse bietet.

Eingegangen am 22. Oktober 2010

Online veröffentlicht am 30. Dezember 2011

Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

[1] C. Chan, P. J. Carter, *Nat. Rev. Immunology* **2010**, *10*, 301.

- [2] A. Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 683.
 [3] H. K. Binz, P. Amstutz, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1257.
 [4] A. Skerra, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 295.
 [5] W. James in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (Hrsg.: R. A. Meyers), Wiley, Chichester, **2000**, S. 4848.
 [6] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672.
 [7] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818.
 [8] K. Nord, J. Nilsson, B. Nilsson, M. Uhlen, P. Nygren, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 601.
 [9] P. Colas, B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy, R. Brent, *Nature* **1996**, *380*, 548.
 [10] J. Ciesiolka, J. Gorski, M. Yarus, *RNA* **1995**, *1*, 538.
 [11] C. Wilson, J. W. Szostak, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 609.
 [12] Q. Yang, I. J. Goldstein, H. Y. Mei, D. R. Engelke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5462.
 [13] M. Famulok, A. Huttenhofer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4265.
 [14] E. Kraus, W. James, A. N. Barclay, *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5209.
 [15] J. A. Phillips, D. Lopez-Colon, Z. Zhu, Y. Xu, W. Tan, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *621*, 101.
 [16] J. B.-H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2902.
 [17] G. R. Zimmermann, C. L. Wick, T. P. Shields, R. D. Jenison, A. Pardi, *RNA* **2000**, *6*, 659.
 [18] C. Tuerk, S. MacDougall, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6988.
 [19] C. Wilson, J. Nix, J. Szostak, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14410.
 [20] C. Boiziau, E. Dausse, L. Yurchenko, J. J. Toulmè, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12730.
 [21] D. Scarabino, A. Crisari, S. Lorenzini, K. Williams, G. P. Tocchini-Valentini, *EMBO J.* **1999**, *18*, 4571.
 [22] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564.
 [23] R. F. Macaya, P. Schultz, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3745.
 [24] D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688.
 [25] A. R. Ferre-D'Amare, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 57.
 [26] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820.
 [27] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polinsky, *Science* **1994**, *263*, 1425.
 [28] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.
 [29] C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, G. P. Tocchini-Valentini, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
 [30] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656.
 [31] M. G. Wallis, U. von Ahsen, R. Schroeder, M. Famulok, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 543.
 [32] I. Majerfeld, M. Yarus, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 287.
 [33] M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3, 990.
 [34] P. Allen, B. Collins, D. Brown, Z. Hostomsky, L. Gold, *Virology* **1996**, *225*, 306.
 [35] L. S. Green, D. Jellinek, R. Jenison, A. Ostman, C. H. Heldin, N. Janjic, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14413.
 [36] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505.
 [37] C. Romero-Lopez, R. Diaz-Gonzalez, A. Berzal-Herranz, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2007**, *21*, 272.
 [38] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381.
 [39] A. M. Kopylov, V. A. Spiridonova, *Mol. Biol.* **2000**, *34*, 940.
 [40] Y. Yang, D. Yang, H. J. Schluesener, Z. Zhang, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 583.
 [41] A. V. Kulbachinskiy, *Biochemistry* **2007**, *72*, 1505.
 [42] W. Wang, L.-Y. Jia, *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, *37*, 454.
 [43] M. T. Bowser, *Analyst* **2005**, *130*, 128.

- [44] Y. Nonaka, K. Sode, K. Ikebukuro, *Molecules* **2010**, *15*, 215.
- [45] S. H. Jeon, B. Kayhan, T. Ben-Yedidia, R. Arnon, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48410.
- [46] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [47] D. J. King, D. A. Ventura, A. R. Brasier, D. G. Gorestein, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16489.
- [48] F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e86.
- [49] D. Eulberg, S. Klussmann, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 979.
- [50] S. Klussman, A. Noite, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Furste, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112.
- [51] J. J. Liu, G. D. Stormo, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e141.
- [52] M. Bianchini, M. Radrizzani, M. G. Brocardo, G. B. Reyes, S. C. Gonzalez, T. A. Santa-Coloma, *J. Immunol. Methods* **2001**, *252*, 191.
- [53] S. Jeong, S. R. Han, Y. J. Lee, S.-W. Lee, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 379.
- [54] M. Djordjevic, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 179.
- [55] J. C. Cox, A. D. Ellington, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2525.
- [56] D. Eulberg, K. Buchner, C. Maasch, S. Klussmann, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e45.
- [57] J. Charlton, G. P. Kirschenheuter, D. Smith, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3018.
- [58] D. Smith, G. P. Kirschenheuter, J. Charlton, D. M. Guidot, J. E. Repine, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 741.
- [59] R. K. Mosing, M. T. Bowser in *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols, Vol. 535* (Hrsg.: G. Mayer), Humana Press, New York, **2009**, S. 1.
- [60] R. K. Mosing, M. T. Bowser, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1420.
- [61] S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 20.
- [62] K.-T. Guo, A. Paul, C. Schichor, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 668.
- [63] X. Fang, W. Tan, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 48.
- [64] D. H. Burke, J. H. Willis, *RNA* **1998**, *4*, 1165.
- [65] S. M. Shamah, J. M. Healy, S. T. Cload, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 130.
- [66] J. D. Smith, L. Gold, 2004, US-Patent 6,706,482.
- [67] K. B. Jensen, B. L. Atkinson, M. C. Willis, T. H. Koch, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12220.
- [68] M. C. Golden, B. D. Collins, M. C. Willis, T. Koch, *J. Biotechnol.* **2000**, *81*, 167.
- [69] M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, H. J. Schlusener, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16464.
- [70] K. N. Morris, K. B. Jensen, C. M. Julin, M. Weil, L. Gold, *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2902.
- [71] G. Mayer, M.-S. L. Ahmed, A. Dolf, E. Endl, P. A. Knolle, M. Famulok, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1993.
- [72] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 83.
- [73] C. Lorenz, F. von Pelchrzim, R. Schroeder, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2204.
- [74] A. D. Keefe, S. T. Cload, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 448.
- [75] L. Wu, J. F. Curran, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1512.
- [76] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850.
- [77] M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1410.
- [78] J. D. Wen, D. M. Gray, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e182.
- [79] E. Roulet, S. Busso, A. A. Camargo, A. J. Simpson, N. Mermod, P. Bucher, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 831.
- [80] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, et al., *PLoS One* **2010**, *5*, e15004.
- [81] C. Wang, M. Zhang, G. Yang, D. Zhang, H. Ding, H. Wang, M. Fan, B. Shen, N. Shao, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 15.
- [82] A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e130.
- [83] W. H. Pan, P. Xin, G. A. Clawson, *BioTechniques* **2008**, *44*, 351.
- [84] S. P. Ohuchi, T. Ohtsu, Y. Nakamura, *Biochimie* **2006**, *88*, 897.
- [85] R. White, C. Rusconi, E. Scardino, A. Wolberg, J. Lawson, M. Hoffman, B. Sullenger, *Mol. Ther.* **2001**, *4*, 567.
- [86] T. R. Keeney, C. Bock, L. Gold, S. Kraemer, B. Lollo, M. Nikrad, M. Stanton, A. Stewart, J. D. Vaught, J. J. Walker, *JALA* **2009**, *14*, 360.
- [87] Y. Miyachi, N. Shimizu, C. Ogino, A. Kondo, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e21.
- [88] C. J. Huang, H. I. Lin, S. C. Shiesh, G. B. Lee, *Proc. Micro-TAS'09*, **2009**, 150.
- [89] J. Qian, X. Lou, Y. Zhang, Y. Xiao, H. T. Soh, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5490.
- [90] I. C. Baines, P. Colas, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 334.
- [91] F. Hoppe-Seyler, K. Butz, *J. Mol. Med.* **2000**, *78*, 426.
- [92] P. Colas, *J. Biol.* **2008**, *7*, 2.
- [93] F. Hoppe-Seyler, I. Crnkovic-Mertens, C. Denk, B. A. Fitscher, B. Klevenz, E. Tomai, K. Butz, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *78*, 105.
- [94] M. Crawford, R. Woodman, P. K. Ferrigno, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2003**, *2*, 72.
- [95] F. Hoppe-Seyler, I. Crnkovic-Mertens, E. Tomai, K. Butz, *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 529.
- [96] J. Lofbom, J. Feldwisch, V. Tolmachev, J. Carlsson, S. Stahl, F. Y. Frejd, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2670.
- [97] C. Gronwall, S. Stahl, *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 254.
- [98] R. C. Ladner, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 426.
- [99] C. R. Geyer, R. Brent, *Methods Enzymol.* **2000**, *328*, 171.
- [100] P. Colas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 54.
- [101] P. A. Nygren, A. Skerra, *J. Immunol. Methods* **2004**, *90*, 3.
- [102] P. A. Nygren, M. Uhlén, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 463.
- [103] T. Hey, E. Fiedler, R. Rudolph, M. Fiedler, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 514.
- [104] R. J. Hosse, A. Rothe, B. E. Power, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 14.
- [105] C. Bourghouts, C. Kunz, B. Groner, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, *5*, 783.
- [106] R. Woodman, J. T. H. Yeh, S. Laursen, P. J. Ko Ferrigno, *Mol. Biol.* **2005**, *352*, 1118.
- [107] T. Hoffmann, L. K. J. Stadler, M. Busby, Q. Song, A. T. Buxton, S. D. Wagner, J. J. Davis, P. Ko Ferrigno, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2010**, *23* 403.
- [108] R. A. Miller, B. F. Binkowski, P. J. Belshaw, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 945.
- [109] A. Skerra, *FEBS J.* **2008**, *275*, 2677.
- [110] L. Xu, P. Aha, K. Gu, R. G. Kuimelis, M. Kurz, T. Lam, A. C. Lim, H. Liu, P. A. Lohse, L. Sun, S. Weng, R. W. Wagner, D. Lipovsek, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 933.
- [111] M. R. Abedi, G. Caponigro, A. Kamb, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 623.
- [112] T. C. Norman, D. L. Smith, P. K. Sorger, B. L. Drees, S. M. O'Rourke, T. R. Hughes, C. J. Roberts, S. H. Friend, S. Fields, A. W. Murray, *Science* **1999**, *285*, 591.
- [113] H. K. Binz, P. Amstutz, A. Kohl, M. T. Stumpp, C. Briand, P. Forrer, M. G. Grutter, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 575.
- [114] K. Nord, E. Gunneriusson, J. Ringdahl, S. Stahl, M. Uhlen, P. A. Nygren, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 772.
- [115] M. Andersson, J. Ronnmark, I. Arestrom, P. A. Nygren, N. Ahlberg, *J. Immunol. Methods* **2003**, *283*.
- [116] P. A. Nygren, *FEBS J.* **2008**, *275*, 2668.
- [117] F. Nilsson, V. Tolmachev, *Curr. Opin. Drug. Discovery Dev.* **2007**, *10*, 167.
- [118] S. Krause, H. U. Schmoldt, A. Wentzel, M. Ballmaier, K. Friedrich, H. Kolmar, *FEBS J.* **2007**, *274*, 86.
- [119] A. Christmann, K. Walter, A. Wentzel, R. Krätzner, H. Kolmar, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 797.
- [120] A. Wentzel, A. Christmann, T. Adams, H. Kolmar, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 7273.
- [121] A. Williams, L. G. Baird, *Transfus. Apher. Sci.* **2003**, *29*, 255.

- [122] C. Neylon, *Nucleic Acid Res.* **2004**, *32*, 1448.
- [123] S. Fields, O. Song, *Nature* **1989**, *340*, 245.
- [124] A. Gaida, U. B. Hagemann, D. Mattay, C. Rauber, K. M. Müller, K. M. Arndt in *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*, Band 535 (Hrsg.: G. Mayer), Humana Press, New York, **2009**, S. 263.
- [125] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315.
- [126] G. Georgiou, D. L. Stephens, C. Stathopoulos, H. L. Poetschke, J. Mendenhall, C. F. Earhart, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 239.
- [127] P. Samuelson, E. Gunneriusson, P. A. Nygren, S. Stahl, *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 129.
- [128] P. H. Bessette, J. J. Rice, P. S. Daugherty, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 731.
- [129] D. Lipovsek, A. Plukthun, *J. Immunol. Methods* **2004**, *290*, 51.
- [130] E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Gyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 123.
- [131] T. A. Ciulla, P. J. Rosenfeld, *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2009**, *20*, 158.
- [132] D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, N. Janjic, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10450.
- [133] L. S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L. A. Beebe, B. D. Feistner, S. C. Gill, F. M. Jucker, N. Janjic, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 683.
- [134] C. A. Trujillo, A. A. Nery, J. M. Alves, A. H. Martins, H. Ulrich, *Clin. Ophthalmol.* **2007**, *1*, 393.
- [135] S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 5.
- [136] J. F. Lee, G. M. Stovall, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 282.
- [137] J. Zhou, J. J. Rossi, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1144.
- [138] P. R. Bouchard, R. M. Hutabarat, K. M. Thompson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 237.
- [139] J. O. McNamara II, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilbo, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005.
- [140] D. Shangguan, Y. Li, Z. Tang, Z. Cao, Z. Xiao, H. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C. J. Yang, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11838.
- [141] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029.
- [142] K. A. Davis, B. Abrams, Y. Lin, S. D. Jayasena, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 702.
- [143] H. Ulrich, C. Wrenger, *Cytometry Part A* **2009**, *75 A*, 727.
- [144] K. Sefah, Z. W. Tang, D. H. Shangguan, H. Chen, D. Lopez-Colon, Y. Li, P. Parekh, J. Martin, L. Meng, J. A. Phillips, Y. M. Kim, W. H. Tan, *Leukemia* **2009**, *23*, 235.
- [145] N. Li, J. N. Ebright, G. M. Stovall, X. Chen, H. Hanh Nguyen, A. Singh, A. Syrett, A. D. Ellington, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2438.
- [146] Z. Li, P. Huang, R. He, J. Lin, S. Yang, X. Zhang, Q. Ren, D. Cui, *Mater. Lett.* **2010**, *64*, 375.
- [147] J. A. Phillips, Y. Xu, Z. Xia, Z. H. Fan, W. Tan, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1033.
- [148] W. J. Kang, J. R. Chae, Y. L. Cho, J. D. Lee, S. Kim, *Small* **2009**, *5*, 2519.
- [149] G. Liu, X. Mao, J. A. Phillips, H. Xu, W. Tan, L. Zeng, *J. Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10013.
- [150] G. J. Tong, S. C. Hsiao, Z. M. Carrico, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11174.
- [151] Y.-F. Huang, Y.-W. Lin, Z.-H. Lin, H.-T. Chang, *J. Nanopart. Res.* **2009**, *11*, 775.
- [152] Y. Wu, K. Sefah, H. Liu, R. Wang, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5.
- [153] G. Wang, Y. Wang, L. Chen, J. Choo, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1859.
- [154] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1237.
- [155] T. Hianik, J. Wang, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1223.
- [156] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 108.
- [157] T. H. Nguyen, J. P. Hilton, Q. Lin, *Microfluid. Nanofluid.* **2009**, *6*, 347.
- [158] I. Willner, M. Zayats *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6528; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408.
- [159] K. Sefah, J. A. Phillips, X. Xiong, L. Meng, D. Van Simaey, H. Chen, W. Tan, *Analyst* **2009**, *134*, 1765.
- [160] A. K. H. Cheng, D. Sen, H. Z. Yu, *Bioelectrochemistry* **2009**, *77*, 1.
- [161] S. Tombelli, M. Mascini, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009**, *11*, 179.
- [162] E. Baldrich, A. Restrepo, C. K. O'Sullivan, *J. Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7053.
- [163] S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1602.
- [164] G. S. Baird, *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, *134*, 529.
- [165] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini in *Aptamers in Bioanalysis* (Hrsg.: M. Mascini), Wiley, Hoboken, **2009**, S. 159.
- [166] J. Wang, H. S. Zhou, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7174.
- [167] Z. Zhang, C. Chen, X. S. Zhao, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1316.
- [168] J. L. Chávez, W. Lyon, N. Kelley-Loughnane, M. O. Stone, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 23.
- [169] J. H. Lee, M. V. Yigit, D. Mazumdar, Y. Lu, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 592.
- [170] C. Deng, J. Chen, L. Nie, Z. Nie, S. Yao, *J. Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9972.
- [171] W. A. Zhao, W. Chiuman, M. A. Brook, Y. F. Li, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 727.
- [172] W. A. Zhao, W. Chiuman, J. C. F. Lam, S. A. McManus, W. Chen, Y. G. Cui, R. Pelton, M. A. Brook, Y. F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3610.
- [173] H. Huang, G. Jie, R. Cui, J.-J. Zhu, *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 816.
- [174] A. K. H. Cheng, H. Su, Y. A. Wang, H. Z. Yu, *J. Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6130.
- [175] L. N. Cella, P. Sanchez, W. Zhong, N. V. Myung, W. Chen, A. Mulchandani, *J. Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2042.
- [176] H.-M. So, K. Won, Y. H. Kim, B.-K. Kim, B. H. Ryu, P. S. Na, H. Kim, J.-O. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11906.
- [177] R. Yang, Z. Tang, J. Yan, H. Kang, Y. Kim, Z. Zhu, W. Tan, *J. Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7408.
- [178] L. Zhang, H. Wei, J. Li, T. Li, D. Li, Y. Li, E. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1897.
- [179] K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya, *J. Anal. Chem.* **2007**, *79*, 782.
- [180] K. Maehashi, K. Matsumoto, Y. Takamura, E. Tamiya, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1285.
- [181] E. E. Ferapontova, K. V. Gothelf, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1261.
- [182] E. E. Ferapontova, K. V. Gothelf, *Langmuir* **2009**, *25*, 4279.
- [183] A. K. Cheng, B. Ge, H. Z. Yu, *J. Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5158.
- [184] F. Wei, C. M. Ho, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1943.
- [185] J. Wang, F. Wang, S. Dong, *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *626*, 1.
- [186] Z. S. Wu, M. M. Guo, S. B. Zhang, C. R. Chen, J. H. Jiang, G. L. Shen, R. Q. Yu, *J. Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2933.
- [187] J. S. Swensen, Y. Xiao, B. S. Ferguson, A. A. Lubin, R. Y. Lai, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4262.
- [188] H. Ceretti, B. Ponce, S. A. Ramirez, J. M. Montserrat, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 147.
- [189] E. S. Q. Tan, R. Wivanius, C. S. Toh, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 749.
- [190] Y. Xiao, D. Piorek, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17990.
- [191] Y. Xiao, T. Uzawa, R. J. White, D. DeMartini, K. W. Plaxco, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1267.
- [192] R. J. White, A. A. Rowe, K. W. Plaxco, *Analyst* **2010**, *135*, 589.

- [193] X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, C. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1042.
- [194] R. Y. Lai, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Anal. Chem.* **2006**, *79*, 229.
- [195] J. Chen, J. Zhang, J. Li, H.-H. Yang, F. Fu, G. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 996.
- [196] E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner, *J. Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9291.
- [197] E. Sharon, R. Freeman, R. Tel-Vered, I. Willner, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1291.
- [198] X. Zuo, Y. Xiao, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6944.
- [199] Y. Du, C. Chen, J. Yin, B. Li, M. Zhou, S. Dong, E. Wang, *J. Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1556.
- [200] H. Wang, Y. Liu, C. Liu, J. Huang, P. Yang, B. Liu, *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 258.
- [201] C. Ding, Y. Ge, J.-M. Lin, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1290.
- [202] Y. Wang, K. Lee, J. Irudayaraj, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 613.
- [203] A. Csordas, A. E. Gerdon, J. D. Adams, J. Qian, S. Soo Oh, Y. Xiao, H. T. Soh, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 365; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 355.
- [204] J. Wang, A. Munir, Z. Li, H. S. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 124.
- [205] J. Pultar, U. Sauer, P. Domnanich, C. Preininger, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1456.
- [206] L. Fang, Z. Lü, H. Wei, E. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *628*, 80.
- [207] Y. H. Tennico, D. Hutano, M. T. Koesdjojo, C. M. Bartel, V. T. Remcho, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5591.
- [208] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1466.
- [209] K. I. Papamichael, M. P. Kreuzer, G. G. Guilbault, *Sens. Actuators B* **2007**, *121*, 178.
- [210] N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3808.
- [211] N. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2547.
- [212] C. Bardou, C. Borie, M. Bickle, B. B. Rudkin, P. Colas in *Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols*, Vol. 535 (Hrsg.: G. Mayer), Humana Press, New York, **2009**, S. 373.
- [213] V. Tolmachev, A. Orlova, R. Pehrson, J. Galli, B. Baastrup, K. Andersson, M. Sandström, D. Rosik, J. Carlsson, H. Lundqvist, A. Wennborg, F. Y. Nilsson, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2773.
- [214] F. Alexis, P. Basto, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, L. Zhang, E. Pridgen, A. Z. Wang, S. L. Marein, K. Westerhof, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1839.
- [215] A. Puri, G. Kramer-Marek, R. Campbell-Massa, A. Yavlovich, S. C. Tele, S. B. Lee, J. D. Clogston, A. K. Patri, R. Blumenthal, J. Capala, *J. Liposome Res.* **2008**, *18*, 293.
- [216] S. Myhre, P. Henning, M. Friedman, S. Stahl, L. Lindholm, M. K. Magnusson, *Gene Ther.* **2009**, *16*, 252.
- [217] V. Tolmachev, A. Orlova, F. Y. Nilsson, J. Feldwisch, A. Wennborg, L. Abrahamsén, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2007**, *7*, 555.
- [218] V. Tolmachev, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 2999.
- [219] C. Zahnd, M. Kawe, M. T. Stumpp, C. de Pasquale, R. Tamaszkovic, G. Nagy-Davidescu, B. Dreier, R. Schibli, H. K. Binz, R. Waibel, A. Plückthun, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1595.
- [220] J. J. Davis, J. Tkac, S. Laurenson, P. Ko Ferrigno, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1089.
- [221] S. Johnson, D. Evans, S. Laurenson, D. Paul, A. G. Davies, P. Ko Ferrigno, C. Wälti, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 978.
- [222] J. J. Davis, J. Tkac, R. Humphreys, A. T. Buxton, T. Lee, P. Ko Ferrigno, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3314.
- [223] D. Evans, S. Johnson, S. Laurenson, A. G. Davies, P. Ko Ferrigno, C. Wälti, *J. Biol.* **2008**, *7*, 3.
- [224] P. Estrela, D. Paul, P. Li, S. D. Keighley, P. Migliorato, S. Laurenson, P. Ko Ferrigno, *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 6489.
- [225] M. Friedman, S. Lindström, L. Ekerljung, H. Andersson Svahn, J. Carlsson, H. Brismar, L. Gedda, F. Y. Frejd, S. Stahl, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, *54*, 121.
- [226] T. Engfeldt, B. Renberg, H. Brumer, P. A. Nygren, A. E. Karlström, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1043.
- [227] B. Renberg, P. A. Nygren, M. Eklund, A. E. Karlström, *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 72.
- [228] R. Ostroff, W. Bigbee, W. Franklin et al., *PLoS One* **2010**, *5*, e15003.
- [229] J. Muller, T. Becher, J. Braunstein, P. Berdel, S. Gravius, F. Rohrbach, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Potzsch, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6199; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6075.
- [230] Y. Zhang, Y. Chen, D. Han, I. Ocsoy, W. Tan, *Bioanalysis* **2010**, *2*, 907.
- [231] R. N. Veedu, J. Wengel, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 536.
- [232] I. Lebars, T. Richard, C. Di Primo, J.-J. Tolumé, *Blood Cells Mol. Dis.* **2007**, *38*, 204.
- [233] P. E. Nielsen, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 689.
- [234] T. L. Hendrickson, V. de Crécy-Lagard, P. Schimmel, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 147.