

## Aptamer-basierte Affinitätsmarkierung von Proteinen\*\*

Jan L. Vinkenborg, Günter Mayer und Michael Famulok\*

Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide, die für die molekulare Erkennung der unterschiedlichsten Zielstrukturen vielseitige Verwendung finden. Sie sind durch eine als „systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX)“ bezeichnete Selektionstechnik zugänglich.<sup>[1]</sup> Bislang wurden Aptamere hauptsächlich für die Bindung an kleine Moleküle<sup>[2]</sup> oder Proteine<sup>[3]</sup> evolviert und anschließend chemisch modifiziert, um sie in verschiedenen In-vitro-Assays einsetzen zu können.<sup>[4]</sup> Neuerdings entwickeln sich aber sowohl die Selektion als auch die Anwendung von Aptameren in Richtung weitaus komplexerer Zielstrukturen, wie Zellen,<sup>[5]</sup> Gewebeschnitte<sup>[6]</sup> oder sogar lebender Organismen.<sup>[7]</sup> Darin offenbart sich einerseits ein großer Vorteil der SELEX-Technik, denn diese Zielstrukturen können ohne Kenntnis des eigentlich vom Aptamer erkannten Moleküls selektiv und hochaffin gebunden werden; sind jedoch Aptamere gegen derart komplexe Zielstrukturen identifiziert, kehrt sich andererseits genau diese Unkenntnis in einen großen Nachteil um, weil ohne dieses Wissen keine Weiterentwicklung beispielsweise als analytisches Hilfsmittel oder als Biomarker für bestimmte Krankheitszustände möglich ist. Diese Einschränkungen erfordern Techniken, die eine rationale Identifizierung unbekannter Zielmoleküle eines Aptamers ermöglichen. Solche Methoden wären aber auch für Komplexe zwischen Aptameren und bekannten Zielmolekülen von großem Nutzen, vor allem dann, wenn das Aptamer im Zellinneren (als so genanntes „Intramer“)<sup>[8]</sup> zur Target-Validierung eingesetzt werden soll. So könnten etwa durch Inhibition seines Zielmoleküls bestimmte intrazelluläre Signalwege beeinflusst und daraus wiederum Rückschlüsse auf dessen biologische Funktion gezogen werden. Damit eine biologische Antwort eindeutig der Inhibition eines bestimmten Proteins zugeordnet werden kann, muss Klarheit über weitere im Proteom enthaltene Zielstrukturen herrschen, die durch das Aptamer möglicherweise ebenfalls inhibiert werden (Off-Target-Effekte).

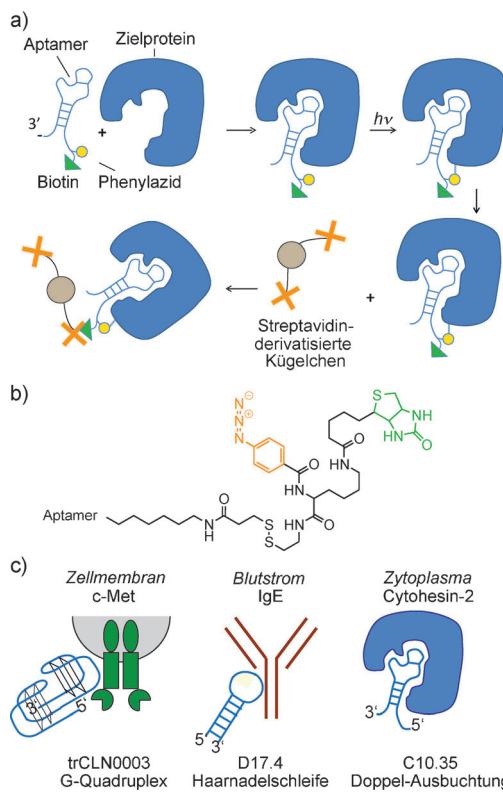
Ähnliche Anforderungen werden an niedermolekulare Proteinagonisten und -antagonisten gestellt. Für niedermolekulare Verbindungen wurden deshalb rationale Methoden wie die affinitätsbasierte Proteom-Profilierung (ABPP) entwickelt, um die Bindungspartner im gesamten Proteom zu identifizieren.<sup>[9]</sup> Ein zentraler Aspekt der ABPP ist die Verwendung (photo)reaktiver Derivate von Wirkstoffen, die zur kovalenten Vernetzung der Substanz mit ihren Bindungspartnern führt. Dies ermöglicht das Auffangen transienter Wechselwirkungen und das Anlegen stringenter Waschbedingungen für eine wirkungsvolle Aufreinigung der vernetzten Spezies aus dem komplexen Proteingemisch. Im Unterschied zu ABPP ist die proteomweite Profilierung oder die Identifizierung von Zielproteinen für Aptamere kaum verbreitet.<sup>[6,10]</sup> Ein einzelnes Beispiel beschreibt die Vernetzung eines mit photoreaktiven 5-Ioddesoxyuridinresten derivatisierten Aptamers mit dem Ziel, den gebundenen Liganden auf der Zelloberfläche zu identifizieren.<sup>[10b]</sup> Allerdings umfasst diese Methode die recht aufwändige Optimierung der Positionierung der photoaktiven Reste, um einen Verlust der Bindungsaaffinität zu vermeiden. Es ist davon auszugehen, dass für andere Aptamer/Protein-Paare jedes Mal eine erneute Optimierung erfolgen muss, was die generelle Anwendbarkeit dieser Technik deutlich einschränkt.

Wir berichten hier über die Entwicklung einer generell anwendbaren Strategie, mit deren Hilfe eine rationale Identifizierung von Zielstrukturen für Aptamere in komplexen Gemischen möglich wird und die wir als „Aptamer-basierte Affinitätsmarkierung“ (aptamer-based affinity labeling, ABAL; Abbildung 1a,b) bezeichnen. Bei der ABAL wird der Affinitätsverlust, der oft mit der Einführung photoreaktiver Nukleotide in ein Aptamer einhergeht, vermieden, indem die für die Vernetzung mit der gebundenen Zielstruktur benötigte Sonde am 5'-Ende des Aptamers angebracht wird (Abbildung 1b). Die von uns verwendete Sonde war ursprünglich für die „Markierungs-Übertragungs-Reaktion“ (label transfer reaction) zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickelt worden.<sup>[11]</sup> Außer dem Phenylazid als Vernetzungsgens, das grundsätzlich auch gegen andere vernetzbare Reste wie Diazirinderivate ausgetauscht werden könnte, enthält sie auch einen Biotinrest, der nach Inkubation mit einer Avidin- oder Streptavidinmatrix für die Anreicherung des Aptamer/Protein-Konjugats genutzt werden kann. Um eine möglichst breite Anwendbarkeit der ABAL-Strategie zu demonstrieren, wählten wir drei ganz unterschiedliche, bestimmten Kriterien genügende Aptamer/Protein-Paare als Testsysteme aus. Zum einen sollten die Aptamere eine gewisse Vielfalt in ihren jeweiligen Sekundärstrukturen und damit eine möglichst breite Diversität an Strukturmotiven aufweisen, wie G-Quadruplexe, Haarnadelschleifen oder interne Ausbuchtungen (Abbildung 1c und Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Zum anderen wählten wir Aptamere, deren Zielproteine primär in unterschiedlichen zellulären Umgebungen zu finden sind, und zwar an der Zell-

[\*] Dr. J. L. Vinkenborg, Prof. G. Mayer, Prof. M. Famulok  
Universität Bonn, LIMES Institut, Chemical Biology & Med. Chem.  
Unit c/o Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)  
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de  
Homepage: <http://www.famuloklab.de>

[\*\*] Diese Arbeit wurde unterstützt von der European Science Foundation (Synapta), der Alexander von Humboldt-Stiftung (J.L.V.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 645). Wir danken A. Schmitz für Diskussionen, V. Fieberg für technische Unterstützung und K. Schopen für Hilfe bei der Charakterisierung des D17.4-Aptamers.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204174> zu finden.



**Abbildung 1.** Prinzip der Aptamer-basierten Affinitätsmarkierung. a) Nach Inkubation mit dem Zielprotein wird das Aptamer durch UV-Bestrahlung mit dem Protein vernetzt. Die nachfolgende Inkubation mit magnetischen Kugelchen, die mit Streptavidin ummantelt sind, ermöglicht eine Aufreinigung des Aptamer/Protein-Komplexes. b) Chemische Struktur der ABAL-Einheit. c) Aptamer/Protein-Paare, die hier verwendet wurden.

oberfläche, dem Blutstrom und im Zytoplasma (Abbildung 1c).

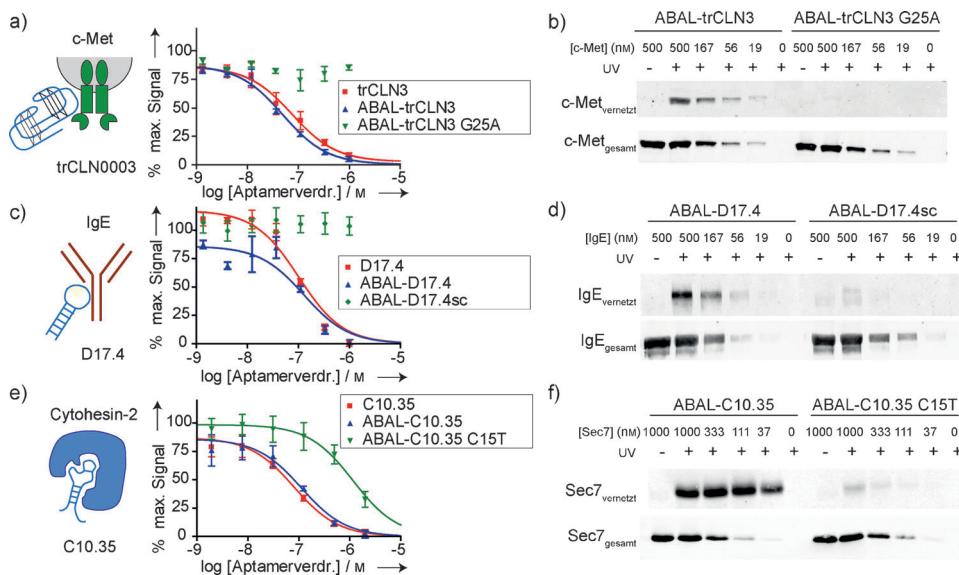
Als erstes Beispiel wendeten wir die ABAL-Strategie auf das kürzlich beschriebene DNA-Aptamer CLN0003 (in der Folge als CLN3 bezeichnet) an, das die Ektodomäne des Membranproteins HGFR (hepatocyte growth factor receptor) erkennt, auch bekannt unter dem Kürzel c-Met.<sup>[12]</sup> Unserer Analyse zufolge enthält dieses Aptamer zwei G-Quadruplex-Strukturen (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Eine auf 40 Nukleotide verkürzte Variante von CLN3 (trCLN3), die c-Met mit nanomolarer Affinität bindet, wurde an ihrem 5'-Ende mit der ABAL-Sonde modifiziert (Hintergrundinformationen, Abbildung S1).<sup>[12]</sup> Mit Umkehrphasen-HPLC wurde das so modifizierte Aptamer von der nicht abreaktierten ABAL-Sonde und nicht funktionalisierten Aptamer abgetrennt. Zur Überprüfung des Einflusses der ABAL-Sonde auf die Bindungseigenschaften des Aptamers führten wir Filterretentionsanalysen durch, bei denen das 5'-ABAL-funktionalisierte trCLN3 mit nichtderivatisiertem trCLN3 um die Bindung an c-Met konkurrierte (Abbildung 2a). Der  $IC_{50}$ -Wert von ABAL-trCLN3 wurde zu  $(50 \pm 8)$  nm quantifiziert, was dem Wert von  $(76 \pm 17)$  nm entspricht, der für trCLN3 gemessen wurde. Dieser Befund zeigt, dass die Funktionalisierung des 5'-Endes des Aptamers die Bindungsaffinität nicht beeinflusst.

Wir konzipierten zusätzlich eine nichtbindende G25A-Punktmutante von trCLN3 (Hintergrundinformationen, Abbildung S2) und zeigten, dass die ABAL-trCLN3-G25A-Variante keine Bindung an c-Met in den getesteten Konzentrationsbereichen mehr aufwies (Abbildung 2a). Dadurch bestätigten wir nicht nur die G-Quadruplexstruktur des Aptamers, sondern entwickelten gleichzeitig eine aussagekräftige Negativkontrolle, mit der wir das Ausmaß der unspezifischen Vernetzung direkt studieren konnten.

Anschließend untersuchten wir, ob ABAL-trCLN3 mit gereinigtem c-Met vernetzt werden kann. Dazu inkubierten wir c-Met in einer Konzentrationsreihe zwischen  $0.5 \mu\text{M}$  und  $19 \text{ nm}$  mit  $250 \text{ nm}$  des ABAL-funktionalisierten Aptamers und bestrahlten anschließend bei  $365 \text{ nm}$ . Abbildung 2b zeigt, dass ohne UV-Bestrahlung keine Vernetzung festzustellen ist. Nach der UV-Bestrahlung konnte eine starke Vernetzung von ABAL-trCLN3 mit  $0.5 \mu\text{M}$  c-Met beobachtet werden, die selbst bei Konzentrationen von  $19 \text{ nm}$  noch gut zu detektieren war (Abbildung 2b). Dagegen zeigte die Punktmutante ABAL-trCLN3 G25A selbst bei  $0.5 \mu\text{M}$  c-Met nur geringfügige Vernetzung; eine Quantifizierung der Bandenintensitäten bei  $0.5 \mu\text{M}$  c-Met ergab hier ein 24-fach niedrigeres Signal als bei ABAL-trCLN3. Dieser Unterschied zeigt eindeutig die Abhängigkeit der Vernetzungsreaktion von der Kombination aus Bindung und Bestrahlung.

Die 5'-Funktionalisierung sollte eine breite Anwendbarkeit der ABAL-Strategie auf vielzählige Aptamere ermöglichen. Man könnte nun einwenden, dass der Phenylazidrest möglicherweise zu weit vom gebundenen Protein entfernt ist, um eine effiziente Vernetzung zu gewährleisten. Vergleicht man jedoch die eingesetzte Gesamtmenge an c-Met mit dem vernetzten Anteil, so ergibt sich eine Vernetzungseffizienz von etwa 30% (Hintergrundinformationen, Abbildung S3). Im Einzelfall wurde zwar über eine Vernetzungseffizienz von über 80% berichtet,<sup>[13]</sup> allerdings ist die durch ABAL erzielte Effizienz deutlich besser als die Werte von 5 bis 20%, die normalerweise mit 5-Bromdesoxyuridin- oder 5-Ioddesoxyuridin-funktionalisierten Aptameren erzielt werden,<sup>[14]</sup> und vergleichbar mit 2,4-Dinitro-5-fluorphenylazid enthaltenden mRNAs.<sup>[15]</sup> Demnach zeigen die hier erreichten hohen Vernetzungswerte, dass die Positionierung der ABAL-Sonde am 5'-Ende des Aptamers den Phenylazidrest nahe genug an das Zielprotein heranbringt, um eine effiziente Vernetzung zu gewährleisten, gleichzeitig aber genügend weit von der Bindestelle entfernt ist, um Affinitätsverluste zu vermeiden.

Nachdem wir das ABAL-Prinzip für trCLN3 entwickelt hatten, galt es nun, die Methode auf zwei weitere Aptamer-Protein-Paare anzuwenden, um die Allgemeingültigkeit abzuschätzen. Dazu wählten wir das Immunglobulin E (IgE) bindende DNA-Aptamer D17.4 aus,<sup>[16]</sup> dessen Zielprotein hauptsächlich im Blutstrom vorkommt. Des Weiteren wendeten wir das DNA-Aptamer C10.35,<sup>[17]</sup> dessen Zielprotein die Sec7-Domäne des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Cytohesin-2 ist, ein zytoplasmatisches Protein, das an der Aktivierung von kleinen GTPasen oder Rezeptortyrosinkinasen beteiligt ist.<sup>[18]</sup> Auch im Hinblick auf ihre Sekundärstruktur unterscheiden sich beide Aptamere voneinander und von CLN3. D17.4 bildet eine einfache Haarnadelschleife, während C10.35 aus einer Haarnadelschleife mit zwei inneren



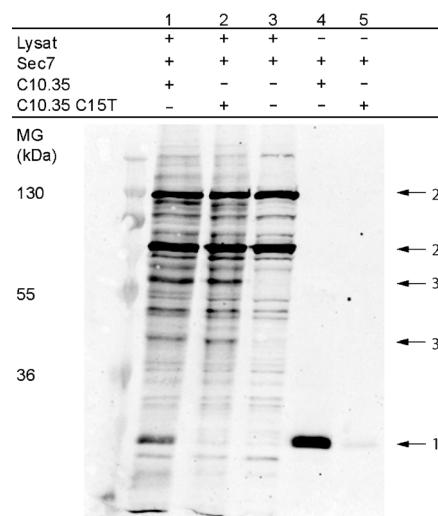
**Abbildung 2.** Charakterisierung von ABAL-funktionalisierten Aptameren. a) Filterretentionsassay, bei dem steigende Konzentrationen ABAL-funktionalisierter Varianten von trCLN3 mit radioaktiv markiertem trCLN3 um die Bindung an das Zielprotein c-Met konkurrieren. Die Kurvenanpassungen wurden unter der Annahme der Konkurrenz um eine einzelne Bindestelle durchgeführt. b) Western-Blot-Analyse der Vernetzung zwischen ABAL-trCLN3 mit einem aus der c-Met-Ektodomäne und der IgG-Fc-Domäne bestehenden Fusionsprotein (c-Met-Fc). c), d) entsprechend zu (a) und (b) unter Verwendung des Aptamers ABAL-D17.4 und Immunglobulin E (IgE). e), f) entsprechend zu (a) und (b) unter Verwendung des Aptamers C10.35 und der Sec7-Domäne von Cytohesin-2. In (b), (d) und (f) wurde fluoreszenzmarkiertes Neutravidin zur Bestimmung der Menge an vernetztem Protein verwendet. Die Gesamtmenge an Proteinen wurde mit Antikörpern bestimmt, die spezifisch gerichtet sind gegen c-Met (b), IgE (d) und den Hexahistidin-Anker (f).

Ausbuchungen besteht (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Auch für diese beiden Aptamere haben wir nicht-bindende Varianten als Negativkontrollen verwendet. Im Falle von D17.4 wurde die Sequenz des Aptamers als Zufallsabfolge hergestellt (D17.4sc), für C10.35 verwendeten wir die bereits bekannte nichtbindende Punktmutante C10.35 C15T.<sup>[17]</sup> Weder bei C10.35 noch bei D17.4 ergab sich aus der 5'-Modifikation mit der ABAL-Sonde eine Beeinträchtigung der Bindungsaffinitäten zu den jeweiligen Zielproteinen (Abbildung 2c,e). Wieder wurden hohe Werte für die UV-abhängige Vernetzung bei beiden Aptameren erhalten, wohingegen nur ganz geringfügige Vernetzung für die nichtbindenden Aptamervarianten lediglich bei den höchsten Proteinkonzentrationen zu detektieren war (Abbildung 2d,f). Die Quantifizierung der Vernetzungsbanden bei den höchsten Proteinkonzentrationen ergab für IgE eine 17-fache Differenz zwischen D17.4 und seiner Negativkontrolle, bei Sec7 einen 7-fachen Unterschied zwischen Aptamer und Punktmutante. Diese Befunde sind vergleichbar mit den für ABAL-trCLN3 erhaltenen und zeigen, dass das ABAL-Prinzip potenziell für eine große Variationsbreite von Aptamer/Protein-Komplexen angewendet werden kann.

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung von ABAL in so vielen unterschiedlichen biologischen Kontexten und Assays wie möglich ist die Fähigkeit, Zielmoleküle auch in komplexen Gemischen zuverlässig und spezifisch zu vernetzen. Um dies zu überprüfen, bestrahlten wir den ABAL-C10.35/Sec7-Komplex mit UV-Licht in Gegenwart von Lysat aus humanen H460-Zellen. Tatsächlich konnten wir eine dem

Molekulargewicht von Sec7 entsprechende Bande im Lysat wieder finden, wohingegen diese Bande im Falle der nichtbindenden Mutante ABAL-C10.35 C15T fehlt (Abbildung 3, Pfeil 1). Die Vernetzung von ABAL C10.35 mit seinem Zielprotein ist demnach auch in komplexen Proteingemischen möglich. Allerdings zeigen sich im Blot auch eine ganze Reihe weiterer Banden. Die durch Pfeil 2 markierten intensiven Banden röhren wahrscheinlich von endogen biotinylierten Proteinen her, denn sie werden auch bei der Vernetzung einer niedermolekularen ABPP-Sonde für Sec7 gefunden.<sup>[19]</sup> Dafür spricht auch, dass diese Banden verschwinden, wenn das Lysat mit Streptavidin-ummantelten Kugelchen vorbehandelt wird (Daten nicht gezeigt). Pfeil 3 in Abbildung 3 verweist auf Banden, die bei Behandlung mit der bindenden wie auch

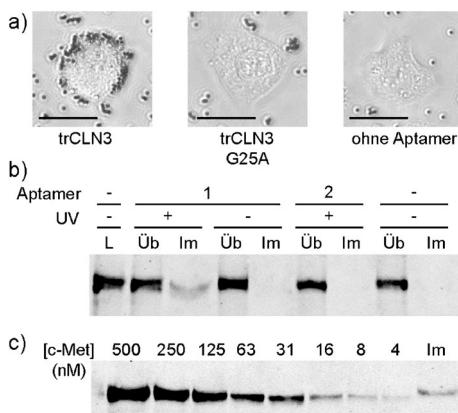
mit der nichtbindenden Variante gefunden werden, nicht jedoch in Abwesenheit der ABAL-Oligonukleotide. Deshalb resultieren diese Banden wahrscheinlich entweder aus der



**Abbildung 3.** Western-Blot-Analyse der Vernetzung von Sec7 mit einer ABAL-funktionalisierten Variante des Aptamers C10.35 in Gegenwart von H460-Zellsatz. 250 nM des Aptamers wurden einer Lösung aus 2 mg ml<sup>-1</sup> Lysat zugefügt (Spur 1–2), das mit 1 μM Sec7-Domäne versetzt war. Spur 3: Lysat/Sec7 ohne Aptamer. Spuren 4 und 5: ohne Lysat. Die Visualisierung der vernetzten Produkte erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Neutravidin.

unspezifischen Bindung der ABAL-Sonde an bestimmte Proteine, oder sie repräsentieren Nukleinsäure bindende Proteine. Diese Banden demonstrieren aber auch die Wichtigkeit der Verwendung des nichtbindenden ABAL-Aptamers als Negativkontrolle. Die verbleibenden Banden in den Spuren 1 und 2 werden auch gefunden, wenn gar kein Aptamer zugegeben wurde (Spur 3), und zeigen deswegen höchstwahrscheinlich die unspezifische Bindung des Farbstoff-konjugierten Neutravidins an Proteine im Lysat an.

Das ABAL-Prinzip eröffnet die Möglichkeit der direkten Anwendung auf Zelloberflächenproteine im Kontext lebender Zellen. Dies würde nicht nur die Identifizierung der Zielproteine eines durch Zell-SELEX evolvierten Aptamers ermöglichen, sondern auch das Methodenrepertoire der spezifischen Zelloberflächenmarkierung erweitern. Um dies zu überprüfen, inkubierten wir H1838-Zellen, eine NSCLC(non-small cell lung carcinoma)-Zelllinie, die c-Met überexprimiert,<sup>[20]</sup> mit 250 nm ABAL-trCLN3, gefolgt von UV-Bestrahlung. Nach Zugabe von magnetischen Kugelchen, die mit Streptavidin ummantelt sind, wurden die so behandelten Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Wie aus Abbildung 4a (links) ersichtlich ist, zeigen die mit ABAL-trCLN3 behandelten Zellen erhöhte Bindung der Kugelchen an ihre Oberfläche. Praktisch keine Bindung erhielten wir nach Verwendung von ABAL-trCLN3 G25A (Abbildung 4a, Mitte) oder ohne Aptamer (Abbildung 4a, rechts). Dieser Befund demonstriert nicht nur die Anwendbarkeit von ABAL auf Zielproteine im Kontext lebender Zellen, sondern zeigt auch, dass die *in vitro* beobachtete Spezifität erhalten bleibt. Die derart effiziente und spezifische Markierung von Zellen mit



**Abbildung 4.** Photoaffinitätsmarkierung von c-Met auf der Oberfläche von H1838-Zellen. a) Lichtmikroskopische Abbildung der Bindung von Streptavidin-ummantelten magnetischen Kugelchen an H1838-Zellen, die mit ABAL-trCLN3 (links), ABAL-trCLN3 G25A (Mitte) oder keinem Aptamer (rechts) inkubiert wurden (Maßstabsleiste 25  $\mu$ m). b) Western-Blot-Analyse des Überstandes (Üb) oder der an die magnetischen Kugelchen immobilisierten (Im) Anteile der Proben, die mit ABAL-trCLN3 (1), ABAL-trCLN3 G25A (2) oder keinem Aptamer (-) behandelt wurden, mit und ohne UV-Bestrahlung. Probe L enthält H1838-Zelllysat ohne Aptamer. c) Western-Blot-Analyse einer abnehmenden Konzentrationsreihe von c-Met-Fc (R&D Systems, MG = 123 kDa) sowie der an den magnetischen Kugelchen immobilisierten (Im) Anteile des vernetzten Aptamers 1 aus (b) nach UV-Bestrahlung. Die Visualisierung der vernetzten Produkte in (b) und (c) erfolgte mit Kaninchen-gegen-c-Met in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem Ziege-gegen-Kaninchen-IgG.

magnetischen Kugelchen erweitert zudem das Methodenrepertoire für die magnetische Zellsortierung, die bis dato auf die Magnetisierung durch Antikörper beschränkt war.<sup>[21]</sup>

Um zu untersuchen, ob das gebundene c-Met angereichert werden kann, lysierten wir die H1838-Zellen nach der Vernetzung und setzten anschließend die mit Streptavidin ummantelten magnetischen Kugelchen hinzu. Eine Western-Blot-Analyse ergab eine Anreicherung von c-Met in Gegenwart von ABAL-trCLN3 (Abbildung 4b). Bei Verwendung der G25A-Mutante oder in Abwesenheit des Aptamers wurde jedoch keine Bande detektiert, was wiederum die Wichtigkeit sowohl der spezifischen Bindung als auch der UV-induzierten Vernetzung auch für die Anreicherung des Zielproteins aus komplexen Gemischen illustriert. Die Quantifizierung der angereicherten c-Met-Bande ergab eine Gesamtmenge von 45–90 fmol (Abbildung 4c), was innerhalb der Detektionsgrenzen für nano-LC-MS liegt.

Zusammengefasst zeigt unsere Studie, dass sich die hier vorgestellte Aptamer-basierte Affinitätsmarkierung (ABAL), bei der die Affinität und Spezifität von Aptamern sowie deren unkomplizierte chemische Modifizierung genutzt werden, hervorragend als Vernetzungsstrategie eignet. Durch die Derivatisierung des 5'-Endes mit der photoreaktiven ABAL-Sonde konnten drei verschiedene Aptamer/Protein-Paare, die große Unterschiede in ihren Sekundärstrukturen aufweisen, ohne Affinitätsverlust hocheffizient und spezifisch vernetzt werden. In dieser Hinsicht unterscheidet sich unsere Methode von früheren Studien, bei denen mithilfe der Photo-SELEX-Methode<sup>[22]</sup> Aptamere evolviert wurden, die 5-Brom-2'-desoxyuridinreste enthielten. Zwar konnte die Photoreaktivität der resultierenden Aptamere elegant genutzt werden, um entweder deren Bindestelle zu identifizieren<sup>[23]</sup> oder um die Empfindlichkeit von Multiplex-Mikroarrays zu verbessern,<sup>[10a,24]</sup> jedoch erfordern auch diese Anwendungen für jedes einzelne Zielprotein eine komplette neue Photo-SELEX. ABAL ist nicht nur für gereinigte Proteinproben geeignet, sondern funktioniert auch in hoch komplexen biologischen Proben, wie Zelllysaten oder sogar direkt an Membranen lebender Zellen. Somit eröffnet diese Methode neue Möglichkeiten zur Target-Identifizierung bereits vorhandener oder neu isolierter Aptamere und ermöglicht die präzise Untersuchung von Aptamer-Wechselwirkungen in der komplexen Umgebung von Zellen oder biomedizinischen Proben. Grundsätzlich sollte das von uns vorgestellte ABAL-Prinzip auch auf andere für Nukleinsäuren etablierte terminale Biokonjugationsmodule anwendbar sein.<sup>[25]</sup>

Eingegangen am 29. Mai 2012

Online veröffentlicht am 2. August 2012

**Stichwörter:** ABPP · Aptamere · Photoaffinitätsmarkierung · Proteomik · Zell-SELEX

[1] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822; c) M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979–988; d) M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.

[2] M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324–329.

[3] J. R. Collett, E. J. Cho, A. D. Ellington, *Methods* **2005**, *37*, 4–15.

[4] a) M. Famulok, G. Mayer, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1349–1358; b) J. L. Vinkenborg, N. Karnowski, M. Famulok, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 519–527; c) A. B. Iliuk, L. Hu, W. A. Tao, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4440–4452.

[5] a) D. Shangguan, L. Meng, Z. C. Cao, Z. Xiao, X. Fang, Y. Li, D. Cardona, R. P. Witek, C. Liu, W. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 721–728; b) M. S. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5268–5271; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190–5193; c) K. T. Guo, R. Schafer, A. Paul, G. Ziemer, H. P. Wendel, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 701–705; d) K. T. Guo, G. Ziemer, A. Paul, H. P. Wendel, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 668–678; e) P. Parekh, Z. Tang, P. C. Turner, R. W. Moyer, W. Tan, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8642–8649; f) G. Mayer, M. S. Ahmed, A. Dolf, E. Endl, P. A. Knolle, M. Famulok, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1993–2004; g) P. Dua, S. Kim, D. K. Lee, *Methods* **2011**, *54*, 215–225; h) Y. H. Kim, H. J. Sung, S. Kim, E. O. Kim, J. W. Lee, J. Y. Moon, K. Choi, J. E. Jung, Y. Lee, S. S. Koh, S. G. Rhee, K. Heo, I. H. Kim, *Cancer Lett.* **2011**, *313*, 76–83; i) W. Sun, L. Du, M. Li, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 80–91.

[6] S. Li, H. Xu, H. Ding, Y. Huang, X. Cao, G. Yang, J. Li, Z. Xie, Y. Meng, X. Li, Q. Zhao, B. Shen, N. Shao, *J. Pathol.* **2009**, *218*, 327–336.

[7] J. Mi, Y. Liu, Z. N. Rabbani, Z. Yang, J. H. Urban, B. A. Sullenger, B. M. Clary, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 22–24.

[8] a) M. Famulok, M. Blind, G. Mayer, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 931–939; b) K. H. Choi, M. W. Park, S. Y. Lee, M.-Y. Jeon, M. Y. Kim, H. K. Lee, J. Yu, H.-J. Kim, K. Han, H. Lee, K. Park, W. J. Park, S. Jeong, *Mol. Canc. Ther.* **2006**, *5*, 2428–2434; c) S. J. Klug, A. Hüttenhofer, M. Kromayer, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6676–6681; d) G. Mayer, M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4961–4965; e) M. G. Theis, A. Knorre, B. Kellersch, J. Moelleken, F. Wieland, W. Kolanus, M. Famulok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11221–11226.

[9] a) J. Eirich, R. Orth, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12144–12153; b) M. B. Nodwell, S. A. Sieber, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 1–41; c) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 822–827; d) D. K. Nomura, M. M. Dix, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 630–638; e) S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274–281; f) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546.

[10] a) D. A. Daniels, H. Chen, B. J. Hicke, K. M. Swiderek, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15416–15421; b) P. Mallikaratchy, Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan, W. Tan, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 2230–2238; c) M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, H. Schluesener, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16464–16468; d) M. V. Berezovski, M. Lechmann, M. U. Musheev, T. W. Mak, S. N. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9137–9143; e) D. Shangguan, Z. Cao, L. Meng, P. Mallikaratchy, K. Sefah, H. Wang, Y. Li, W. Tan, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2133–2139.

[11] K. A. Jacobson, B. Fischer, A. M. van Rhee, *Life Sci.* **1995**, *56*, 823–830.

[12] A. Boltz, B. Piater, L. Toleikis, R. Guenther, H. Kolmar, B. Hock, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21896–21905.

[13] T. H. Koch, D. Smith, E. Tabacman, D. A. Zichi, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 1159–1173.

[14] K. M. Meisenheimer, T. H. Koch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 101–140.

[15] M. Zenkova, C. Ehresmann, J. Caillet, M. Springer, G. Karpova, B. Ehresmann, P. Romby, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 726–735.

[16] T. W. Wiegand, P. B. Williams, S. C. Dreskin, M. H. Jouvin, J. P. Kinet, D. Tasset, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 221–230.

[17] G. Mayer, A. Lohberger, S. Butzen, M. Pofahl, M. Blind, A. Heckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6561–6564.

[18] a) W. Kolanus, *Immunol. Rev.* **2007**, *218*, 102–113; b) A. Bill, A. Schmitz, B. Albertoni, J. N. Song, L. C. Heukamp, D. Walrafen, F. Thorwirth, P. J. Verveer, S. Zimmer, L. Meffert, A. Schreiber, S. Chatterjee, R. K. Thomas, R. T. Ullrich, T. Lang, M. Famulok, *Cell* **2010**, *143*, 201–211; c) M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, *Nature* **2006**, *444*, 941–944; d) A. Bill, H. Blockus, D. Stumpfe, J. Bajorath, A. Schmitz, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8372–8379.

[19] B. Albertoni, J. S. Hannam, D. Ackermann, A. Schmitz, M. Famulok, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1272–1274.

[20] P. C. Ma, R. Jagadeeswaran, S. Jagadeesh, M. S. Tretiakova, V. Nallasura, E. A. Fox, M. Hansen, E. Schaefer, K. Naoki, A. Lader, W. Richards, D. Sugabaker, A. N. Husain, J. G. Christensen, R. Salgia, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1479–1488.

[21] A. Grützkau, A. Radbruch, *Cytometry Part A* **2010**, *77*, 643–647.

[22] M. C. Golden, B. D. Collins, M. C. Willis, T. H. Koch, *J. Biotechnol.* **2000**, *81*, 167–178.

[23] M. C. Golden, K. A. Resing, B. D. Collins, M. C. Willis, T. H. Koch, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2806–2812.

[24] C. Bock, M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, M. N. Hurst, G. M. Husar, D. Miller, R. Ostroff, H. Petach, D. Schneider, B. Vant-Hull, S. Waugh, A. Weiss, S. K. Wilcox, D. Zichi, *Proteomics* **2004**, *4*, 609–618.

[25] a) J. Wower, K. V. Rosen, S. S. Hixson, R. A. Zimmermann, *Biochimie* **1994**, *76*, 1235–1246; b) S. Kellner, S. Seidu-Larry, J. Burhenne, Y. Motorin, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 7348–7360; c) M. L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78.