

Entwicklung und Anwendung Aptamer-basierter Microarrays zum Nachweis rekombinanter Proteine

Förderungszeitraum: 01.07.2009 – 30.06.2011

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Produktion vieler biologisch aktiver Proteine gelingt in der Biotechnologie mit Hilfe von Zellkulturtechniken. Die Proteine werden dabei in Mikroorganismen oder Säugetierzellen produziert. Dadurch ergibt sich häufig eine hohe Komplexität des Rohproduktes, welches das gewünschte Zielprotein oft nur als Minor Komponente enthält. Vor diesem Hintergrund werden effektive Methoden zur Detektion der Zielproteine notwendig. Ziel des bearbeiteten Forschungsprojektes war daher die Bereitstellung neuartiger Aptamer-basierter Methoden zur Detektion der Zielproteine. Dabei sollten zwei große Gruppen der rekombinanten Proteine erfasst werden:

1. His-getaggte Fusionsproteine: Aptamere gegen den His-Tag sollten als Affinitätselement zur Detektion von Fusionsproteinen genutzt werden. Dadurch sollte ein Universalsensor etabliert werden, der für verschiedene His-getaggte Proteine verwendet werden kann.
2. Antikörper: Im Rahmen des Projekts sollten Aptamere gegen das F_C-Fragment von Antikörpern charakterisiert und zur Aptamer-basierten Detektion von Antikörpern eingesetzt werden.

Um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, sollten Aptamer-Microarrays zur Detektion der Zielproteine entwickelt werden. Dazu sollte eine Kopplungschemie ausgewählt werden, die die Immobilisierung der Aptamere unter Erhalt ihrer aktiven Konformation ermöglicht. Es wurden Protokolle zur Prozessierung der Aptamer-Microarrays entwickelt und die Microarrays hinsichtlich der Kriterien Nachweisgrenze und Spezifität charakterisiert.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die verwendeten Aptamere wurden zunächst hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert, bevor sie auf den Microarrays eingesetzt wurden. Dabei wurden verschiedene Aptamer-Microarray Formate realisiert. Die entwickelten Methoden zur Immobilisierung der Aptamere konnten nicht nur erfolgreich auf Microarrays genutzt werden, es gelang auch, die Immobilisierungsstrategie auf Magnetpartikel zu übertragen und diese Partikel zur Proteinaufreinigung zu verwenden. Im folgenden werden diese Ergebnisse zusammengefasst.

2.1. Bereitstellung und Charakterisierung der Aptamere

Innerhalb des Projektes wurden verschiedene der Literatur entnommene Aptamere gegen den His-Tag verwendet. Diese Aptamere wurden mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens gegenüber dem Target untersucht. Mittels ITC konnte für das gegen den His-Tag gerichtete Aptamer 6H5 eine Dissoziationskonstante (K_D) von 0.9 μM ermittelt werden (Abbildung 1 A). Bei der ITC befinden sich sowohl das Target als auch das Aptamer in Lösung. Die in diesem Projekt zu entwickelnden Aptamer-Microarrays erfordern jedoch eine Immobilisierung der Aptamere auf einem festen Träger. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Aptamere auch nach der Immobilisierung ihre Fähigkeit zur Bindung des Targets beibehalten, wurden die Aptamere auf Goldoberflächen immobilisiert und mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) untersucht. Die Aktivität des Aptamers konnte auch nach Immobilisierung mittels SPR bestätigt werden (Abbildung 1 B).

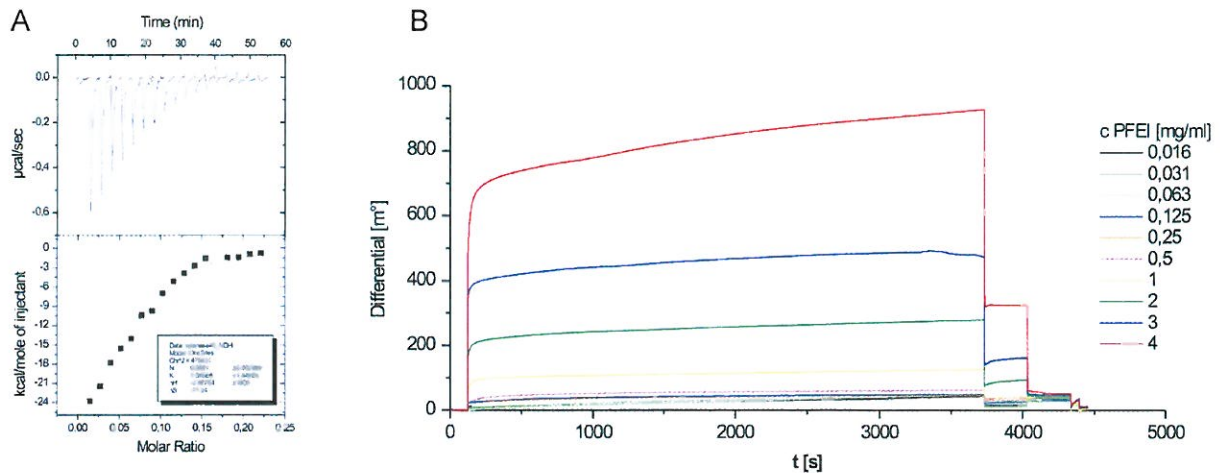


Abbildung 1: Charakterisierung des gegen den His-Tag gerichteten Aptamers 6H5. (A) Bestimmung der Affinität mittels ITC. (B) SPR Sensogramme. Als Zielprotein wurde His-getaggte *Pseudomonas fluorescens* esterase I (PFEI-His) verwendet.

Neben den der Literatur entnommenen Aptameren gegen Affinitäts-Tags wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Aptares (Mittenwalde) Aptamere gegen das F_C-Fragment humaner Antikörper entwickelt. Insgesamt wurden 10 Aptamere gewonnen, die Affinität und Spezifität der Aptamere konnte bisher im Aptamer-Microarray Format (vgl. Abschnitt 2.2), sowie durch die erfolgreiche Anwendung der Aptamere in der Proteinaufreinigung (Abschnitt 2.3) bestätigt werden.

2.2. Detektion im Microarray Format

Die Detektion von Proteinen mit Microarrays ist generell in drei verschiedenen Formaten möglich (Abbildung 2). Im Rahmen dieses Projekts wurden Aptamer-Microarrays in allen drei Formaten realisiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden für die einzelnen Formate dargestellt.

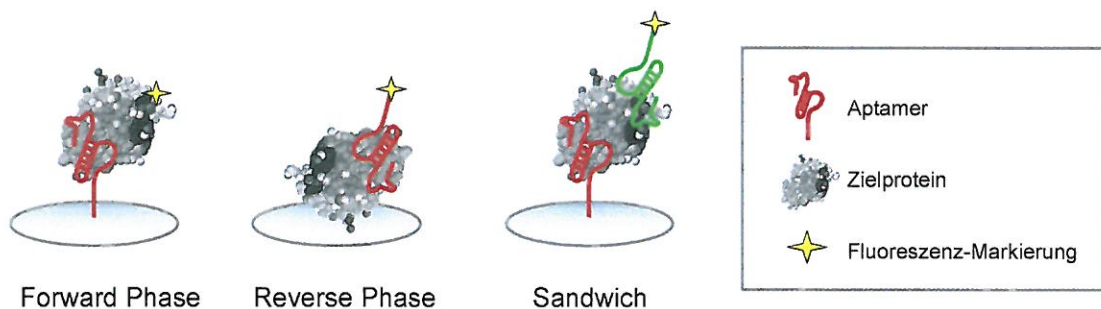


Abbildung 2: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Aptamer Microarray Formate. Im Forward Phase Format wird das Fänger-molekül, in diesem Fall das Aptamer, auf dem Microarray Substrat immobilisiert. Die Detektion des Bindungsereignisses erfolgt durch direkte Fluoreszenzmarkierung des Targets. Im Reverse Phase Format wird dagegen die Probe, die das nachzuweisende Protein enthält, immobilisiert. Hier erfolgt die Detektion mit einem Fluoreszenzmarkierten Detektionsaptamer. Im Sandwich Format wird ein immobilisiertes Fängeraptamer verwendet und das Zielprotein mit einem Fluoreszenzmarkierten Detektionsaptamer detektiert.

2.2.1. Forward Phase Microarray

Zu Beginn des Projektes wurden unterschiedlich modifizierte Microarray-Oberflächen (Aldehyd, Epoxy, Amino) auf ihre Anwendbarkeit für Aptamer-Microarrays untersucht (vgl. Zwischenbericht). Dabei erwies sich insbesondere die Verwendung von Amino-modifizierten Oberflächen zur Immobilisierung von Cyanurchlorid-aktivierten Aptameren als vorteilhaft. Diese Immobilisierungsstrategie wurde daher zum Aufbau der Forward Phase Microarrays verwendet. Um eine optimale Faltung des Aptamers zu gewährleisten, wurden die Oberflächen zusätzlich mit Polyethylenimin (PEI) als Spacer beschichtet.

Unter Verwendung des gegen den His-Tag gerichteten Aptamers 6H7 wurde ein Forward Phase Assay mit einer Nachweisgrenze von 3,3 nM (100 ng/mL) für PFEI-His etabliert. Das Forward Phase Format wurde zudem zur Charakterisierung der Aptamere gegen das F_C-Fragment verwendet. Die gegen das F_C-Fragment gerichteten Aptamere 264-273 wurden nach Cyanurchlorid-Aktivierung auf PEI-modifizierten Microarrays immobilisiert. Um die Funktionalität der Aptamere nach Immobilisierung nachzuweisen, wurden zunächst Bindungsstudien mit dem F_C-Fragment, gegen das die Aptamere selektiert wurden, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle 10 Aptamere auch nach Immobilisierung das Target binden (Abbildung 3 A). Um zu überprüfen, ob die Aptamere neben dem F_C-Fragment auch den vollständigen Antikörper binden können, wurde die Bindung des Fluoreszenzmarkierten Antikörpers untersucht. Auch hier konnte für alle 10 Aptamere eine Bindung beobachtet werden, wobei die Aptamere 264-266 zu den stärksten Fluoreszenzsignalen führten (Abbildung 3 B). Da bei jeder Aptamerselektion mehrere Aptamere generiert werden, stellt die gezielte Auswahl eines Aptamers für eine bestimmte Anwendung ein Problem dar. Der etablierte Forward Phase Assay ermöglicht die parallele Untersuchung der verschiedenen Aptamere, um zum Beispiel die Aktivität der Aptamere nach Immobilisierung zu bestimmen.

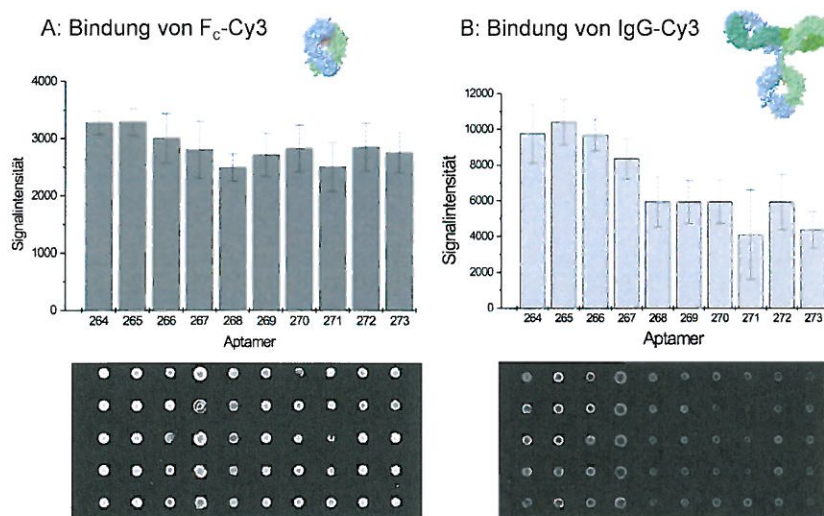


Abbildung 3: Bindungsstudien mit den Aptameren gegen das F_C-Fragment im Forward Phase Format. (A) Bindung des Cy3-markierten F_C-Fragments. (B) Bindung des Cy3-markierten IgGs. Dargestellt sind die Analyse der Signalintensitäten sowie ein Ausschnitt des gesamten Microarrays.

Für das humane F_C-Fragment wurde die Nachweisgrenze im Forward-Phase-Format bestimmt. Hierzu wurden die Microarrays mit verschiedenen Konzentrationen an Cy3-markiertem F_C-Fragment inkubiert. Die kleinste noch nachweisbare Konzentration lag bei allen drei Aptameren bei 1 nM (0,05 µg/ml).

2.2.2. Reverse Phase Microarrays

Das oben beschriebene Forward Phase Format erfordert eine Fluoreszenzmarkierung des Zielproteins. Diese kann insbesondere bei der Verwendung komplexer Proben, die das Zielprotein nur in geringer Konzentration enthalten, problematisch sein.

Daher wurde ein Reverse Phase Microarray zur markierungsfreien Detektion His-getaggtter Proteine entwickelt. In diesem Assay wird die Probe, die das nachzuweisende Protein enthält, auf einer Microarray Oberfläche immobilisiert. Die Detektion erfolgt mit einem Fluoreszenz-markierten Detektionsaptamer. Um hier niedrige Nachweisgrenzen sowie einen möglichst breiten dynamischen Bereich zu erhalten, wurden zunächst unterschiedliche Microarray Oberflächen unter Verwendung eines Antigen/Antikörper-Paares hinsichtlich ihrer Proteinbindungskapazität untersucht. Dabei

zeichneten sich Nitrocellulosemembran-beschichtete Microarrays durch einen hohen dynamischen Bereich und eine niedrige LOD aus.

Der Aptamer-basierte Reverse Phase Microarray wurde daher auf Nitrocellulose-beschichteten Microarrays aufgebaut und zunächst zur Detektion von PFEI-His verwendet. Hier konnten ein Detektionslimit von 300 nM erreicht werden. Um die Anwendbarkeit des Assays für komplexe Proben zu untersuchen, wurden *E. coli* Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung geerntet und aufgeschossen. Die Lysate wurden direkt auf dem Microarray immobilisiert. Mit Hilfe dieses Reverse Phase Assays gelang es, den Konzentrationsanstieg des His-getaggten Zielproteins direkt im Lysat zu verfolgen (Abbildung 4). Der Assay ermöglicht es dabei, sehr viele Proben gleichzeitig auf die Anwesenheit des Zielproteins zu untersuchen und stellt somit ein hochparallelisiertes und kostengünstiges System zum Monitoring der Produktkonzentration während eines biotechnologischen Produktionsprozesses dar.

Vergleichende Versuche mit einem gegen den His-Tag gerichteten Detektionsantikörper zeigten, dass die Verwendung des Aptamers zu höheren SNR-Werten und vergleichbaren Nachweisgrenzen führte. Eine Publikation dieser Ergebnisse wurde eingereicht.

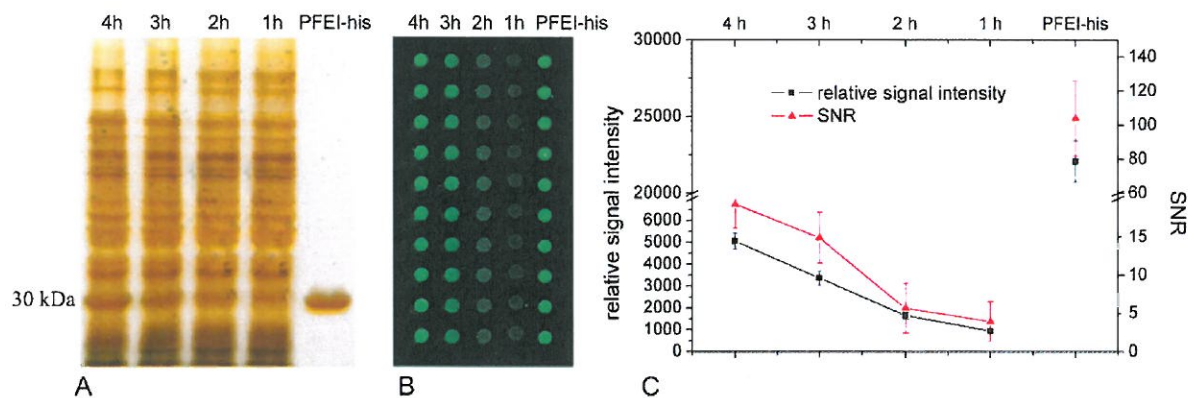


Abbildung 4: Detektion von PFEI-His im Reverse Phase Format. Untersucht wurde eine *E. coli* Kultivierung im Zeitraum 1-4 h nach Induktion der PFEI-His Expression. (A) SDS-PAGE Analyse der untersuchten Proben. (B) Scann des Reverse Phase Microarrays. (C) Analyse der Signalintensität und der SNR. Über den Abbildungen ist der Zeitpunkt der Probenahme nach der Induktion angegeben. Als Referenz wurde zusätzlich 1 mg/ml PFEI-His aufgetragen.

Auch für die Aptamere gegen das F_C Fragment wurde die Anwendbarkeit als Detektionsaptamer im Reverse Phase Format untersucht. Dabei wurden die humanen Immunglobuline IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, sowie humanes Fc-Fragment, polyklonales humanes IgG und polyklonales murines IgG als potentielle Targets verwendet. Um die Spezifität der Aptamere zu untersuchen, wurden BSA und fetales Kälberserum (FCS) in einer Konzentration von 1 mg/mL auf als Negativkontrollen verwendet. Das Aptamer 264 war in der Lage, alle angebotenen Targets zu binden, eine unspezifische Bindung an die Negativkontrollen wurde nicht beobachtet (Abbildung 5).

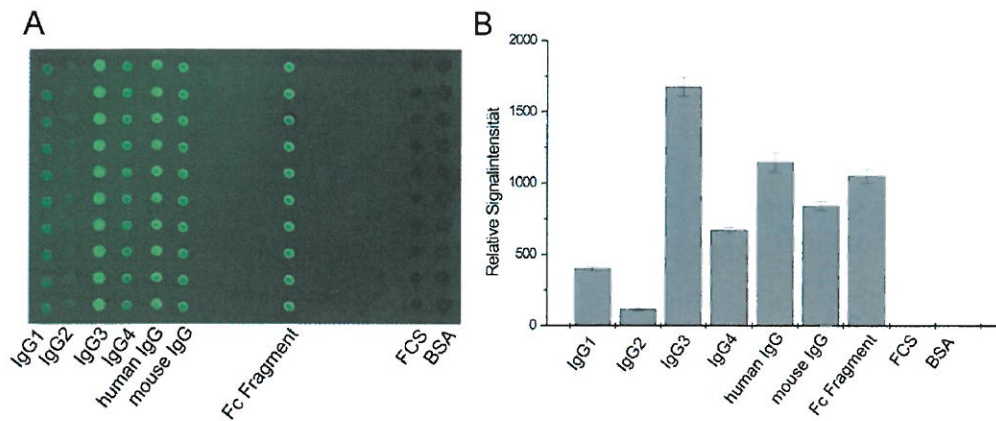


Abbildung 5: Untersuchung der Spezifität des Aptamers 264 im Reverse Phase Format.

Um die Nachweisgrenze des entwickelten Reverse Phase Microarrays zu bestimmen, wurde humanes F_C -Fragment und IgG3 in einer Verdünnungsreihe auf die Nitrocellulose-Slides gespottet und mit den Fluoreszenz-markierten Aptameren inkubiert. Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der relativen Signalintensität von der gespotteten Konzentration des Zielproteins. Die Nachweisgrenze liegt für das F_C Fragment bei 1 μM , die Nachweisgrenze für IgG3 liegt für das 264 und 265 Aptamer bei 313 nM und für das 266-Aptamer bei 63 nM.

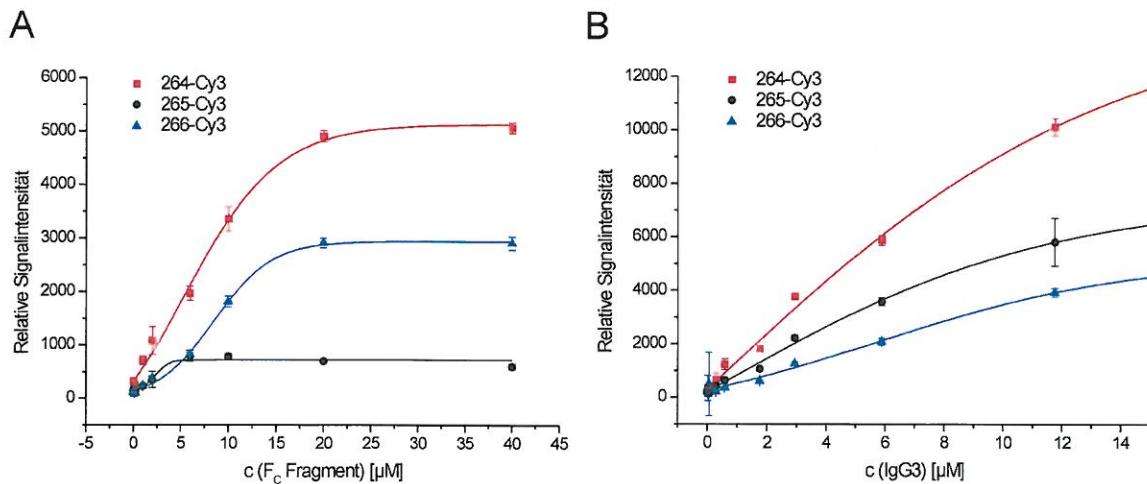


Abbildung 6: Reverse Phase Microarray zur Detektion des humanen F_C -Fragments (A) und humanem IgG3 (B). Dargestellt sind die Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Konzentration des Targets. Der Verlauf der Signalintensität in Abbildung 6B zeigt einen exponentiellen Anstieg, der bei einer IgG3-Konzentration von 12 μM noch nicht in die Sättigung gegangen ist.

2.2.3. Sandwich Assay

Im Forward Phase Format erwies sich die Markierung des Proteins als kritischer Punkt. So ist insbesondere die Markierung von komplexen Proben, die das Zielprotein nur in geringen Konzentrationen enthalten, schwierig. Im Reverse Phase Format konnte eine Methode zur markierungsfreien Detektion von Antikörpern aufgebaut werden. Aufgrund der begrenzten Bindungskapazität der Microarray Oberflächen zeichnen sich diese Assays jedoch durch einen begrenzten dynamischen Bereich aus. Insbesondere bei der Analyse komplexer Proben, bei denen das Zielprotein mit einer Vielzahl an Proteinen um die Bindungsstellen an der Microarray Oberfläche konkurriert, stößt dieses Format an seine Grenzen.

Ausgehend von der erfolgreichen Immobilisierung der Aptamere im Forward Phase Format wurde daher versucht, einen Sandwich Assay zu etablieren. Ein solcher Assay ermöglicht unter Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Detektionsaptamers die Detektion des Zielproteins ohne direkte Markierung. Hier konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, einen solchen Sandwich Assay unter Verwendung der selektierten F_C-Aptamere aufzubauen (Abbildung 7). Dazu wurden drei verschiedene Aptamere (264, 265, 266) auf dem Microarray immobilisiert und mit dem Zielprotein (F_C-Fragment) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Cy3-markiertem 266. Es fällt auf, dass alle drei Kombinationen von Aptameren (264/266-Cy3, 265/266-Cy3, 266/266-Cy3) zum Aufbau eines Sandwich Assays geeignet sind. So gelang der Assay auch unter Verwendung von nur einem Aptamer als Fänger- und Detektionsaptamer (266/266-Cy3). Ursächlich dürfte hierfür die besondere Struktur des F_C-Fragments sein, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht. So wird eine dieser Untereinheiten vom Fängeraptamer gebunden, die andere Untereinheit kann vom Detektionsaptamer erkannt werden. Um nachzuweisen, dass die Bindung spezifisch erfolgt, wurden Versuche ohne F_C-Fragment und mit BSA als Negativkontrolle durchgeführt. Hier konnte kein Signal detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die selektierten Aptamere zum Aufbau eines Sandwich Assays geeignet sind. Derzeit beträgt die Nachweisgrenze 4 nM. Somit konnte im Vergleich zum Reverse Phase Assay bereits eine um den Faktor 16 niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden.

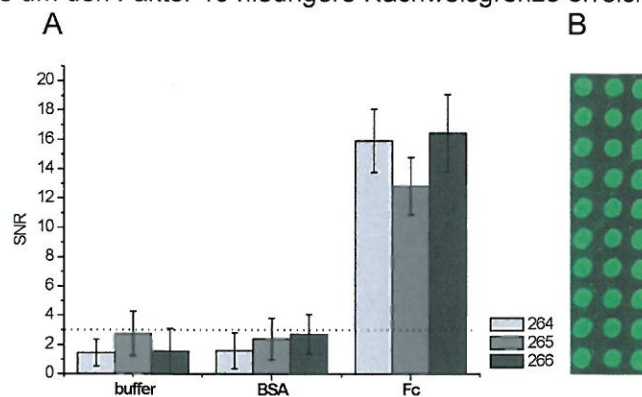


Abbildung 7: Sandwich Assay. (A) Analyse der *Signal to noise ratio* (SNR). Die Aptamere 264, 265 und 266 wurden auf dem Microarray immobilisiert. Es folgte die Inkubation mit dem F_C-Fragment (10 µg/ml). Als Negativkontrollen wurde der Puffer ohne F_C-Fragment und 10 µg/ml BSA verwendet. Die Detektion erfolgte mit Cy3-markiertem Detektionsaptamer 266. (B) Exemplarischer Scann eines Sandwich Assays.

2.3. Aptamere in der Proteinaufreinigung

Die innerhalb des Projektes entwickelte Immobilisierungsstrategie wurde von Microarrays auf Magnetpartikel übertragen und die Aptamer-konjugierten Magnetpartikel wurden erfolgreich für die Proteinaufreinigung verwendet. Dazu wurden die gegen den His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 auf Amino-modifizierten Magnetpartikeln immobilisiert. Nach Optimierung des Aufreinigungsprotokolls wurde die Aufreinigung direkt aus *E. coli* Lysaten durchgeführt. Es wurde eine vergleichende Studie zur Aufreinigung von His-getaggtter *Pseudomonas fluorescens* Esterase I (PFEI-His) und *Bacillus stearothermophilus* Esterase (BSTE-His) aus *E. coli* Lysaten unter Verwendung von 6H7- und 6H5-modifizierten Magnetpartikeln sowie ein direkter Vergleich zur IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) unter Verwendung chelatisierter Co²⁺ Ionen durchgeführt (Abbildung 8). Die His-getaggtten Proteine konnten mit Hilfe der Aptamer-basierten Aufreinigungsstrategie mit bis zu 84 %-iger Reinheit gewonnen werden. Die Aptamer-basierte Aufreinigung His-getaggtter Proteine wurde kürzlich publiziert.

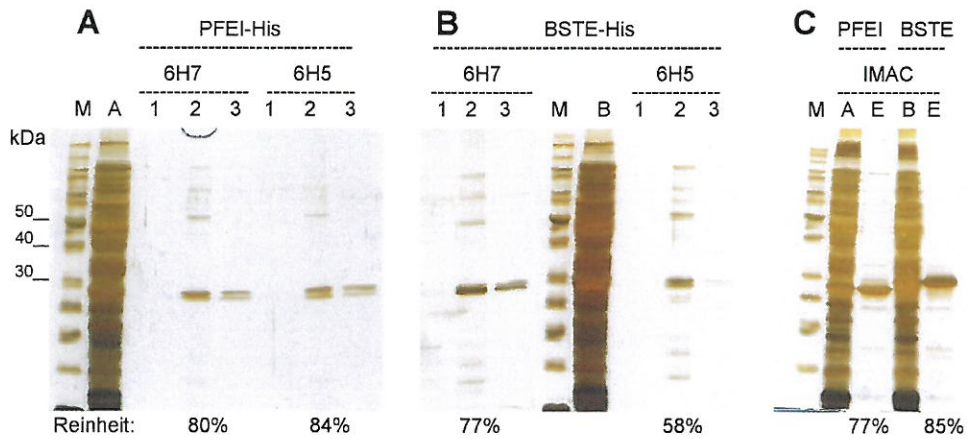


Abbildung 8: Aufreinigung von *Pseudomonas fluorescens* esterase I (PFEI-His) und *Bacillus stearothermophilus* esterase (BSTE-His) aus *E. coli* Lysaten. (A) Aufreinigung von PFEI-His über Aptamer-modifizierte Magnetpartikel. (B) Aufreinigung von BSTE-His über Aptamer-modifizierte Magnetpartikel. Aufgetragen wurden die Lysate (A bzw. B) und jeweils die letzte Waschfraktion (1), die erste Elution (2) sowie die zweite Elution (3). (C) Aufreinigung der beiden Proteine über IMAC. Aufgetragen wurden die Lysate sowie die Elutionsfraktion (E). Die unter den Gelen angegebenen Reinheiten wurden densitometrisch bestimmt.

Die Methode wurde auch auf die Aptamere gegen das F_C Fragment übertragen. Die Aptamere wurden in einem Mg²⁺- und Ca²⁺-haltigem Puffer selektiert. Somit wurden Aptamere generiert, deren dreidimensionale Struktur von diesen divalenten Ionen abhängt. Durch Zugabe von Chelatbildnern kann die dreidimensionale Struktur der Aptamere zerstört werden. Daher gelang die Elution des gebundenen Proteins unter Verwendung von 0,1 M EDTA, wobei durch anschließende Inkubation im Selektionspuffer eine Regeneration der Aptamer-modifizierten Magnetpartikel erreicht werden konnte. Unter Verwendung dieses Protokolls gelang die Aufreinigung von humanem IgG aus 10% bovinem Serum mit einer Reinheit von 97 % (Abbildung 9).

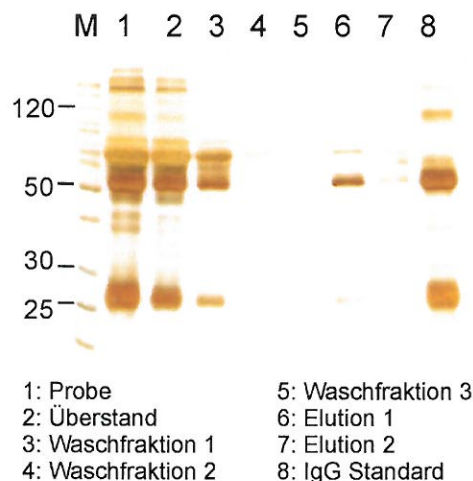


Abbildung 9: SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung von humanem IgG aus 10% bovinem Serum. In der 1. Elution (Spur 6) konnte das aufgereinigte IgG mit 97% Reinheit nachgewiesen werden.

3. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass sich Aptamere für die Detektion von Proteinen mit verschiedenen Microarray Formaten eignen. Dabei konnten Aptamere gegen den His-Tag, erfolgreich im Forward Phase und Reverse Phase Format eingesetzt werden, unter Verwendung der Aptamere gegen das F_C-Fragment konnte auch ein Sandwich Assay etabliert werden. Die erreichten Nachweisgrenzen (LOD, *Limit of Detection*) sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Nachweisgrenzen der entwickelten Microarrays.

Zielprotein	LOD - Forward Phase	LOD - Reverse Phase	LOD - Sandwich
PFEI-His	3,3 nM	300 nM	-
F _C -Fragment	1 nM	1 µM	4 nM

Mit allen Microarray Formaten konnten biotechnologisch relevante Produktkonzentrationen nachgewiesen werden. Ein Problem des Forward Phase Assays ist die Tatsache, dass das Zielprotein hierbei fluoreszenzmarkiert werden muss. Dieses Problem ließ sich durch die Entwicklung von Reverse Phase und Sandwich Microarrays umgehen. Der Sandwich Assay erfordert jedoch stets die Verfügbarkeit von zwei Aptameren, die gegen unterschiedliche Epitope des Zielproteins gerichtet sind, oder aber die Anwesenheit von mehreren identischen Epitopen auf einem einzigen Zielprotein. Daher war die Entwicklung eines Sandwich Assays unter Verwendung der Aptamere gegen den His-Tag nicht möglich. Zur Detektion His-getaggtter Proteine eignete sich insbesondere der Reverse Phase Microarray. Hier konnte auf eine Markierung des His-getaggtten Proteins verzichtet werden und es können nahezu beliebig viele Proben auf einem einzigen Microarray untersucht werden. So konnte der Verlauf der Produktkonzentration während einer *E. coli* Kultivierung mit Hilfe eines Reverse Phase Assays beobachtet werden.

Aptamere konnten darüber hinaus erfolgreich für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden. Dabei wurden Gruppen-spezifische Aufreinigungsverfahren zur Aufreinigung von His-getaggtten Proteinen sowie Antikörpern entwickelt. Diese Aufreinigungsverfahren liefern vergleichbare Aufreinigungseffizienzen wie die herkömmlicherweise verwendeten Methoden (IMAC bzw. Protein A Affinitätschromatographie) und weisen darüber hinaus weitere Vorteile auf. So konnten Aptamere gegen das F_C-Fragment humaner Antikörper entwickelt werden, die die Aufreinigung von Antikörpern unter milderen Bedingungen erlauben als bei Anwendung von Protein A.

4. Öffentlichkeitsarbeit

Publikationen

Öznur Kökpinar, Johanna-Gabriela Walter, Yuval Shoham, Frank Stahl, Thomas Scheper, *Aptamer-based Downstream Processing of His-tagged Proteins Utilizing Magnetic Beads*, *Biotechnology and Bioengineering*, **2011**, May 2. doi: 10.1002/bit.23191. [Epub ahead of print]

Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper, *Anwendungen von Aptameren in der Mikroarray-Technologie*, *BIOspektrum*, **2011**, 17 (2) 162-164, 2011.

Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Michael Reck, Inka Praulich, Yakir Nataf, Marcus Hollas, Karl Pflanz, Dieter Melzner, Yuval Shoham, Thomas Scheper, *Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD*. *Engineering in Life Sciences*, **2010**, 10(2): p. 103-108, 2010.

Eingereichte Publikationen

Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper, *Aptamers as Detection Molecules on Reverse Phase Protein Microarrays*, eingereicht bei *Engineering in Life Sciences*.

Guohong Zhu, Miriam Lübbecke, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, Thomas Scheper, *Characterization of optimal aptamer microarray binding chemistry and spacer design*, eingereicht bei *Chemical Engineering & Technology*.

Publizierte Kongressbeiträge

Johanna-Gabriela Walter, Andreas Kage, *Aptamere - Die chemische Alternative zu Antikörpern*, Vortrag auf der 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, CHEMIE INGENIEUR TECHNIK, **2010**. 82(9): p. 1501-1502.

Johanna-Gabriela Walter, Miriam Lübbecke, Guohong Zhu, Ekaterina Sinitsyna, Frank Stahl, Thomas Scheper, *Microarray-basiertes Screening von Aptameren für analytische Methoden*, Poster auf der 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, CHEMIE INGENIEUR TECHNIK, **2010**. 82(9): p. 1551.

Miriam Lübbecke, M., Johanna-Gabriela Walter, Guohong Zhu, Ekaterina Sinitsyna, Frank Stahl, Thomas Scheper et al., *Strategien für die Detektion von Proteinen mit aptamer-basierten Microarrays*, Poster auf der 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, CHEMIE INGENIEUR TECHNIK, **2010**. 82(9): p. 1546-1547.