

ISOTHERMALE IN VITRO SELEKTION UND
AMPLIFIKATION ZUR UNTERSUCHUNG
VON EVOLUTIONSVORGÄNGEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Sylvia Ehses
aus Bernkastel-Kues

Sankt Augustin 2005

Die Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis Januar 2005 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. G. von Kiedrowski und von Februar 2005 bis April 2005 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. S. McCaskill bei der Fraunhofer Gesellschaft e.V. in Sankt Augustin angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht: S. Ehses, J. Ackermann, J. S. McCaskill: *Optimization and Design of oligonucleotide setup for Strand Displacement Amplification*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63(3): 170-86, 2005.

1. Gutachter: Prof. Dr. J. S. McCaskill
2. Gutachter: Prof. Dr. G. von Kiedrowski
Dritter Prüfer: Prof. Dr. W. Schuhmann
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005

Abstrakt

Hier wird die Entwicklung eines Systems vorgestellt, welches einfache biochemische *in vitro* Systeme zur Untersuchung evolutiver Prozesse nutzt. Als biochemische Reaktion wird die SDA (Strangverdrängungsamplifikation) als DNA-Amplifikationsmechanismus weiterentwickelt und an die Anforderungen eines *in vitro* Evolutionsexperiments angepasst. Neben eines SELEX-Aufbaus beruhend auf Mutation und Selektion von Nukleinsäuren wird das System mit Hinblick auf die Entwicklung eines eigenständigen evolvierbaren Systems bearbeitet. So wird gezeigt, wie sich der Amplifikationsmechanismus in Mikrofluidikstrukturen steuern lässt – ein Schritt in Richtung komplexer Systeme, die helfen, grundlegende Fragen der Evolution zu untersuchen.

Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Als Erstes gebührt der Dank Herrn Prof. Dr. John S. McCaskill, unter dessen Betreuung ich gelernt habe, den behandelten Themenkomplex zu erfassen und zu bearbeiten.

Der Fraunhofer Gesellschaft danke ich für die finanzielle und materielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, unter sehr guten Arbeitsbedingungen diese Arbeit voranzutreiben.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. G. von Kiedrowski, der neben inhaltlichen Diskussionen auch organisatorische Hilfestellungen gab.

Trotz der strukturellen Veränderungen und der zeitweise unruhigen Arbeitsverhältnisse danke ich den einzelnen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe BioMIP für ihre ständige Hilfsbereitschaft und den sympatischen Umgang.

Meinen Eltern danke ich für die unermüdliche Unterstützung während dieser Jahre. Des Weiteren danke ich Stefan, dessen langjährige Begleitung und auch Geduld, vieles einfacher gestaltete. Außerdem danke ich Robert für die manchmal ernüchternden aber auch animierenden Worte.

Ich möchte auch nicht missen, noch so vielen zu danken, die mich bestärkt haben, indem sie einfach daran glaubten, dass dieses Projekt endlich ist...

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Molekulare Evolution	14
1.1.1	<i>In vitro</i> Selektion und SELEX	14
1.1.2	Molekulare Fitnesslandschaften	15
1.2	Isothermale Amplifikationsverfahren	17
1.2.1	Strangverdrängungsamplifikation	17
1.3	Inhalt der Arbeit	20
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Standards	23
2.1.2	Geräte	25
2.1.3	Software	26
2.1.4	Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme	26
2.1.5	Übersicht Oligonukleotide	26
2.1.6	Bakterienstämme und Plasmide	29
2.1.7	Häufig verwendete Pufferlösungen, Medien und Platten	30
2.2	Grundlegende molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	31
2.2.2	DNA-Präparation und Reinigung von Nukleinsäurelösungen	31
2.2.3	Gelelektrophorese	33
2.2.4	Klonierung der Amplifikationsprodukte und Transformation	33
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	35
2.3	SDA	36
2.3.1	Standard SDA	36
2.3.2	<i>Nicking</i> SDA	38
2.3.3	Elongation	38
2.3.4	Experimentelle Optimierung	39

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.