

*Selektion und Charakterisierung
Selektin-spezifischer DNA-
Aptamere*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Rassa Faryammanesh

geboren am 18.09.1981 Teheran/Iran

Hamburg, 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2010 bis März 2014 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn
2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 23.05.2014

Für meine Familie

Es gibt, streng geurteilt, gar keine „voraussetzungslose“ Wissenschaft, der Gedanke einer solchen ist unausdenkbar, paralogisch: eine Philosophie, ein „Glaube“ muß immer erst da sein, damit aus ihm die Wissenschaft eine Richtung, einen Sinn, eine Grenze, eine Methode, ein Recht auf Dasein gewinnt.

Friedrich Nietzsche

Du bist deine eigene Grenze, erhebe dich darüber.

Hafis (Hafeze-Shirazi)

Der Charakter ruht auf der Persönlichkeit, nicht auf den Talenten.

Johann Wolfgang von Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
SUMMARY	XIII
ZUSAMMENFASSUNG	XV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Selektine.....	1
1.1.1 Struktur und Expression der Selektine	1
1.1.2 Selektin-Liganden.....	6
1.1.3 Physiologie der Selektine und der transendothelialen Migration	8
1.1.4 Pathologische Wirkung der Selektine und die Metastasierung	11
1.2 Selektin-relevante Therapieansätze.....	13
1.3 Aptamere.....	14
1.3.1 <i>in vitro</i> Selektion von Aptameren.....	15
1.3.2 Aptamere im Vergleich zu Antikörpern und Glycomimetica.....	16
1.3.3 Aptamere in der Anwendung.....	18
1.4 Zielsetzung.....	19
2 MATERIAL	21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	21
2.3 Materialien.....	23
2.4 Proteine und Standards.....	24
2.5 Nucleotide einschließlich Oligonucleotide.....	25
2.6 Bakterienstämme und Vektoren.....	27
2.7 Zelllinien.....	27
3 METHODEN	28
3.1 Proteinbiochemische Methoden.....	28
3.1.1 Modifizierung von Proteinen.....	28
3.1.1.1 Protein-Biotinylierung	28
3.1.1.2 Biotin-Immobilisierung auf Dynabeads [®] (Prä-Selektionsbeads)	29
3.1.1.3 Protein-Immobilisierung auf Dynabeads [®] (Target-Beads).....	29

3.1.2	Proteinanalytische Methoden.....	30
3.1.2.1	Dialyse	30
3.1.2.2	Dot-Blot	30
3.1.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.2.1	Präparation von Nucleinsäuren	31
3.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
3.2.1.2	Kolonie-PCR.....	32
3.2.2	Modifikation von Nucleinsäuren	33
3.2.2.1	DNA-Strangtrennung.....	33
3.2.2.2	5'-Radioaktivmarkierung von ssDNA	33
3.2.3	Nucleinsäureanalytische Methoden	34
3.2.3.1	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	34
3.2.3.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	35
3.2.3.3	Reinigung von Nucleinsäuren.....	35
3.2.3.4	Diffusionselution von Nucleinsäuren	36
3.2.3.5	Isopropanolpräzipitation	36
3.2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	36
3.2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.4	Nachweis von Nucleinsäuren	37
3.2.4.1	Ethidumbromid-Färbung	37
3.2.4.2	Autoradiographie	37
3.3	<i>In vitro</i> Selektion von DNA-Aptameren (SELEX).....	38
3.4	Klonierungstechniken.....	39
3.4.1	Restriktion von Nucleinsäuren	39
3.4.2	Ligation.....	40
3.4.3	Herstellung von <i>E. coli</i> Zellen zur Transformation mittels Elektroporation	40
3.4.4	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	41
3.4.5	Kultivierung auf LB-Ampicillin-Agar-Platten	41
3.4.6	Isolierung und Sequenzierung der Plasmid-DNA	41
3.5	Charakterisierung identifizierter Aptamere.....	42
3.5.1	Filter-Retentions-Assay (FRA).....	42
3.5.2	Sekundärstrukturvorhersage von Aptameren mittels <i>Mfold</i>	44
3.5.3	Zirkulardichroismus.....	44
3.5.4	UV-Spektroskopie	44
3.5.5	Nuclease-Stabilitäts-Assay	45
3.6	Untersuchung der Aptamer-Protein-Interaktion.....	45
3.6.1	Durchflusszytometrie.....	45
3.6.2	Laminarer-Fluss-Assay.....	46
3.6.2.1	Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen	46
3.6.2.2	Interaktion zwischen Selektin-präsentierenden und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen	47
3.7	Zellbiologische Methoden.....	48
3.7.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	48

3.7.2	Passagieren adhärenter Zellen	48
3.7.3	Cryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Selektion rhE-Selektin-spezifischer DNA-Aptamere und Charakterisierung der angereicherten DNA-Bibliothek	50
4.1.1	Nachweis der rhE-Selektin-Biotinylierung.....	50
4.1.2	<i>In vitro</i> Selektion von Selektin-bindenden DNA-Aptameren	52
4.1.3	Charakterisierung des Bindungsverhaltens der angereicherten DNA-Bibliothek ...	54
4.2	Identifizierung rhE-Selektin-bindender DNA-Aptamere.....	56
4.3	Charakterisierung identifizierter rhE-Selektin-spezifischer-DNA Aptamere.....	59
4.3.1	Überprüfung der Reinheit der verwendeten Proteine	59
4.3.2	Untersuchung der Bindungseigenschaften selektierter Aptamere	59
4.3.2.1	DNA-Aptamer SDA1	59
4.3.2.2	DNA-Aptamer SDA2	62
4.3.3	Sekundärstrukturanalyse.....	65
4.3.3.1	Strukturvorhersage und Verkürzungsversuche des DNA-Aptamers SDA1 mittels <i>mfold</i>	66
4.3.3.2	Sekundärstrukturvorhersage und Verkürzungsversuche des DNA-Aptamers SDA2 mittels <i>mfold</i>	68
4.3.3.3	Analyse der Aptamerfaltung mittels Zirkulardichroismus	71
4.3.4	Nachweis der Aptamer-Stabilität.....	73
4.3.4.1	Charakterisierung der Aptamer-Stabilität mittels Schmelzkurvenanalyse	73
4.3.5	Charakterisierung der Serumstabilität der rhE-Selektin-spezifischen DNA-Aptamere	74
4.4	Untersuchung der Aptamer-Protein-Interaktion.....	75
4.4.1	Einfluss der DNA-Aptamere auf die Interaktion von Selektin und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen.....	75
4.4.2	Einfluss der DNA-Aptamere auf die Interaktion von Selektin-präsentierenden und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen.....	79
5	DISKUSSION	81
5.1	Die Rolle der Selektine im Metastasierungsprozess und mögliche therapeutische Ansätze	81
5.2	SELEX-Prozess zur Anreicherung rhE-Selektin-spezifischer unmodifizierter DNA-Aptamere.....	83
5.2.1	RhE-Selektin-Immobilisierung über die Biotin-Streptavidin-Interaktion	83
5.2.2	Prä-Selektion zur Separation unspezifischer DNA-Moleküle.....	87
5.2.3	Anreicherung von Selektin-spezifischen DNA-Aptameren	87
5.2.4	Klonierung und Identifizierung der Selektin-Spezifischen DNA-Aptamere SDA1 und SDA2	89
5.3	SDA1 und SDA2, rhE-Selektin-spezifische DNA-Aptamere.....	90
5.3.1	Bindung der Aptamere an die Zielproteine	90
5.3.2	Strukturaufklärung DNA-Aptamere SDA1 und SDA2	92

5.3.3	Die Verkürzung der Aptamersequenz führt zum Verlust der Bindungsaffinität.....	97
5.3.4	SDA1 und SDA2 sind über längere Zeit Serumstabil	98
5.4	<i>In vitro</i> Zellkultur-Modell zur Simulation der Selektin Ligand - Selektin Aptamer Interaktion.....	99
5.4.1	Die selektierten Aptamere inhibieren die Selektin Selektin-Ligand-Interaktion unter statsichen Bedingungen	99
5.4.2	Die selektierten Aptamere inhibieren die Selektin-Ligand-Interaktion unter physiologisch simulierten Bedingungen.....	103
5.4.3	Die selektierten Aptamere inhibieren Zell-Zell-Interaktionen unter physiologisch simulierten Bedingungen	104
AUSBLICK		106
LITERATUR		108
PATENT		117
PUBLIKATIONEN		117
VORTRÄGE/PREISE		117
ANHANG		118
DANKSAGUNG		122
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG		124
LEBENS LAUF		125

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der Domänenstruktur der Selektine.....	4
Abbildung 2: Molekülstruktur der Positionsisomere Sialyl-Lewis-X und Sialyl-Lewis-A.....	6
Abbildung 3: Selektine und ihre Liganden.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Protein-Produktion bei einer Entzündungsreaktion und der transendothelialen Migration von Leukozyten.....	10
Abbildung 5: Darstellung der hämatogenen Metastasierung.	12
Abbildung 6: Darstellung eines Aptamer-Target-Komplexes.....	14
Abbildung 7: Darstellung des SELEX-Prozesses.	16
Abbildung 8: Darstellung der möglichen Effekte durch die Bindung des Aptamers an sein Zielprotein.).....	18
Abbildung 9: Anwendungsgebiete von Aptameren.	19
Abbildung 10: Modell der Metastasierung und des Einflusses von E-Selektin-bindenden DNA-Aptameren.	20
Abbildung 11: Biotinylierungsreaktion.....	28
Abbildung 12: Darstellung der PNK- <i>forward</i> -Reaktion.....	34
Abbildung 13: Darstellung der <i>in vitro</i> Prä-Selektion und Selektion von Aptameren.....	38
Abbildung 14: pUC19-T Restriktionsschnittstellen für XcmI.	39
Abbildung 15: Darstellung des Filter-Retentions-Assays.....	43
Abbildung 16: Darstellung der durchflusszytometrischen Studien.....	46
Abbildung 17: Darstellung des Laminar-Flow-Assays.....	47
Abbildung 18: Nachweis der Biotinylierungsreaktion an rhE-Selektin mittels Dot-Blot und SDS-PAGE.....	51
Abbildung 19: Nachweis der PCR-Reaktionen.....	53
Abbildung 20: Nachweis der mittels PNK-Reaktion radioaktiv markierten Nucleinsäuren. ..	54
Abbildung 21: Ermittlung der DNA-Protein-Interaktion der angereicherten DNA-Bibliothek aus den Selektionsrunden 1 und 17 mittels Filter-Retentions-Assay.	55
Abbildung 22: Identifizierung positiver (Insert-enthaltenen) Kolonien durch Kolonie-PCR..	56

Abbildung 23: Darstellung von Sequenzähnlichkeiten mittels eines phylogenetischen Baums.	57
Abbildung 24: Reinheitsbestimmung von den in den Bindungsstudien verwendeten Proteinen mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung.	59
Abbildung 25: Auswertung der SDA1-Protein-Interaktion mittels Filter-Retentions-Assay..	60
Abbildung 26: Auswertung der Interaktion zwischen SDA1 und rhP-Selektin mittels Filter- Retention-Assay..	61
Abbildung 27: Ermittlung der Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen SDA1 und rhE- bzw. rhP-Selektin mittels FRA.	61
Abbildung 28: Auswertung der SDA1-Bindung an murines E- und P-Selektin.....	62
Abbildung 29: Auswertung der SDA2-Protein-Interaktion mittels Filter-Retentions-Assay. .	63
Abbildung 30: Auswertung der Interaktion zwischen SDA2 und rhP-Selektin mittels Filter- Retention-Assay..	64
Abbildung 31: Ermittlung der Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen SDA2 und rhE- bzw. rhP-Selektin mittels FRA.	64
Abbildung 32: Auswertung der SDA2-Bindung an murines E- und P-Selektin.....	65
Abbildung 33: <i>Mfold</i> Sekundärstrukturvorhersage für SDA1..	66
Abbildung 34: <i>Mfold</i> Sekundärstrukturvorhersage für SDA1 und SDA1-M1..	67
Abbildung 35: <i>Mfold</i> Sekundärstrukturvorhersage für SDA2..	69
Abbildung 36: <i>Mfold</i> Sekundärstrukturvorhersage für SDA2 und SDA2-M1..	70
Abbildung 37: CD-spektroskopische Sekundärstrukturanalyse der DNA-Aptamere SDA1 und SDA2.	71
Abbildung 38: Graphische Darstellung der Schmelzkurven für SDA1 und SDA2 in Integral- (1) bzw. Differentialform (2)..	73
Abbildung 39: Auswertung der Nuclease-Resistenz von SDA1 und SDA2 in Vollmedium. .	75
Abbildung 40: Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Bindungsinhibition von rhE- bzw. rhP-Selektin und HT29-Zellen mittels SDA1 bzw. SDA2 in einem statischen System..	77
Abbildung 41: Inhibition der Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Ligand- präsentierenden Zellen in einem dynamischen System.....	78
Abbildung 42: Inhibition der Interaktion zwischen Selektin- und Selektin-Ligand- präsentierenden Zellen in einem dynamischen System.....	80
Abbildung 43: Aminosäuresequenz des rhE-Selektins..	84

Abbildung 44: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe ^x ..	86
Abbildung 45: Sekundärstrukturvorhersage für SDA1	94
Abbildung 46: Sekundärstrukturvorhersage für SDA2.	96
Abbildung 47: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe ^x	101
Abbildung 48: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe ^x	102

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Aufteilung der Aminosäure- (AS) Sequenzlänge bei den humanen Selektinen in die jeweiligen Domänen.....	3
Tabelle 2: Homologie der Selektine.....	4
Tabelle 3: Selektin-Spezifitäten.	5
Tabelle 4: Vor- und Nachteile von Antikörpern.	17
Tabelle 5: Vor- und Nachteile von Aptameren.	17
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen zur Aptamerselektion.	21
Tabelle 7: Verwendete Puffer zur Nucleinsäure-Analyse.....	22
Tabelle 8: Verwendete Kulturmedien und Zusätze.....	22
Tabelle 9: Verwendete Puffer zur Protein-Analyse.	22
Tabelle 10: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten.....	23
Tabelle 11: Materialien für die Aptamerselektion.	23
Tabelle 12: Filter und Membran für den Filter-Retentions-Assay.....	23
Tabelle 13: Materialien für den <i>Flow-Assay</i>	24
Tabelle 14: Kommerziell erhältliche Kits.	24
Tabelle 15: Protein- und DNA-Standards.	24
Tabelle 16: Enzyme.....	24
Tabelle 17: Proteine und Antikörper.....	24
Tabelle 18: Verwendete Nucleotide und Radionucleotide.....	25
Tabelle 19: Kommerziell erworbene Oligonucleotide.....	25
Tabelle 20: Selbstpräparierte Oligonucleotide.....	26
Tabelle 21: Zusammensetzung eines Sammelgels für die SDS-PAGE.	31
Tabelle 22: Zusammensetzung eines Trenngels für die SDS-PAGE.....	31
Tabelle 23: PCR-Mastermix.....	32
Tabelle 24: PCR-Programm für die SELEX.	32
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die 5`-Radioaktivmarkierung von ssDNA.....	34
Tabelle 26: Zusammensetzung eines 10%igen nativen PAA-Gels.....	35
Tabelle 27: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.....	40

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 28: Ligationsansatz.....	40
Tabelle 29: Übersicht wichtiger Charakteristika der durchgeführten Selektionsrunden 1 - 17.	52
Tabelle 30: rhE-Selektin-bindende DNA-Aptamere.....	58
Tabelle 31: Gefahrenpiktogramme laut GHS-Verordnung	118
Tabelle 32: Verwendete Chemikalien mit den entsprechenden Gefahrstoffinformationen	119
Tabelle 33: Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance Units</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EGF	<i>Epidermal Growth Faktor</i>
EOL-1-Zellen	Humane eosinophile Zellen
E-Selektin	Endothel-Selektin
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
Fc	<i>Crystallizable fragment</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FRA	Filter-Retentions-Assay
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward-scatter</i>)
Fuc	Fucose
Fw	<i>Forward</i>

Gal	Galactose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylgalactoseamin
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
HT29-Zellen	Humane Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zellen
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
LAN 1	<i>Human neuroblastoma cell line</i>
L-Selektin	Leukozyten-Selektin
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
min	Minuten
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nucleotid
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	Polyethylenglykol
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase

P-Selektin	Platelet-Selektin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoligand-1
Rev	<i>Reverse</i>
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SCR	<i>Short consensus repeats</i>
SDA	Selektin-DNA-Aptamer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SK-N-SH	<i>Human neuroblastoma cell line</i>
sLe ^A	Sialyl-Lewis-A
sLe ^X	Sialyl-Lewis-X
SOC	<i>Salt-optimized + carbon</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side-scatter</i>)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil (<i>volume-volume percentage</i>)
VCAM	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
w/v	Massenanteil (<i>weight-volume percentage</i>)

SUMMARY

Leukocyte (L), endothelial (E) and platelet (P) selectins are the three members of the selectin family. The physiological function of these cell adhesion glycoproteins is the recruitment and adherence of leukocytes in inflammatory and immune responses. Presented on the endothelial cells, E- and P- selectins are responsible for the adhesion of E- and P-selectin ligand-presenting leukocytes to the endothelium. L-selectin, which is present only on leukocytes, play a key role in the interaction of leukocytes with L-Selectin ligand presenting cells such as endothelial cells. The involvement of selectins, especially E- and P-selectin, has been demonstrated in various pathogeneses. Thus, selectins are among others responsible for the development of thrombosis, atherosclerosis, ischemia and rheumatoid arthritis. Additionally, E- and P-selectin conduct the adhesion of tumor cells to the vascular endothelium, which is a critical step in metastasis. The tumor cells mimic leukocytes by the production of selectin ligands and use the selectin-mediated migratory pathway of leukocytes to metastase.

In vivo studies have shown that the absence of E- and P-selectin leads to a drastic reduction of metastases. One way to prevent the interaction between selectins and selectin ligands by the tumor cells are aptamers. These are short nucleic acids with defined three-dimensional structures displaying high affinity and specificity for target molecules. The binding of aptamer to the target protein can have among others an inhibitory effect.

In this work, with the aim of blocking the interaction between E-selectin and E-selectin ligand presenting cells, two DNA aptamers called SDA1 and SDA2 were selected for E-selectin by using the *in vitro* SELEX-process (**S**ystematic **E**volution of **L**igand by **E**Xponential Enrichment). Via filter retention assay it could be shown that both 91 nucleotide long DNA aptamers are able to bind to E- and P-selectins with a dissociation constant of about 100 nM. Also the binding to murine selectins could be detected. The anti-adhesive effect of the aptamers on the interaction between E- and P-selectin chimera and E- and P-selectin ligand (sialyl Lewis X, sialyl Lewis A) presenting human colon adenocarcinoma grade II cells (HT29) has been shown in a static laminar flow adhesion assay. Also in dynamic laminar flow

assays under physiological shear stress conditions the interaction between immobilized E- or P-selectin chimera and HT29 or human chronic eosinophilic leukemia cell line EOL-1 was inhibited by SDA1 and SDA2. The stability of the aptamers in full medium for more than two hours allowed the studies in *in vitro* cell culture models. In the end, the inhibitory effect of SDA1 and SDA2 on TNF- α stimulated human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs), which presented E-selectin and HT29 cells, was determined.

In summary, two E- and P-selectin specific DNA aptamers were selected in this work, which are able to inhibit the interaction between E- and P-selectin and its ligands under physiological shear conditions. SDA1 and SDA2 are potential new therapeutic agents that can lead to the suppression of selectin-mediated adhesion of tumor cells during metastasis.

In future studies, the effect of the aptamers should be validated *in vivo* by using a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma. In this regard, the stability of SDA1 and SDA2 should be increased.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Familie der Selektine gehören die Leukozyten- (L), Endothel- (E) und *Platelet*- (P) Selektine. Die physiologische Aufgabe von diesen Zell-Adhäsions-Glykoproteinen besteht in der Rekrutierung und Anhaftung von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen und Immunantworten. Die, auf den Endothelzellen präsentierten, E- und P-Selektine sind für die Adhäsion von E- und P-Selektin-Ligand-präsentierenden Leukozyten an das Endothelium verantwortlich, während L-Selektin, welches nur auf Leukozyten präsentiert wird, die Interaktion von Leukozyten mit L-Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen, bewirkt. Die Beteiligung von Selektinen, besonders E- und P-Selektin, wurde bei verschiedenen Pathogenesen nachgewiesen. So spielen Selektine unter anderem bei der Entstehung von Thrombose, Arteriosklerose, Ischämie und rheumatoider Arthritis eine entscheidende Rolle. Zusätzlich leiten E- und P-Selektin die Adhäsion von Tumorzellen an das vaskuläre Endothelium ein, welches ein kritischer Schritt bei der Metastasierung ist. Dabei ahmen die Tumorzellen durch Produktion von Selektin-Liganden die Leukozyten nach und nutzen den Selektin-vermittelten Leukozytenmigrationsweg, um zu metastasieren.

In vivo Studien haben gezeigt, dass die Abwesenheit von E- und P-Selektin zu einer drastischen Reduzierung von Metastasen führt. Eine Möglichkeit, die Interaktion zwischen Selektinen und den, von Tumorzellen präsentierten, Selektin-Liganden zu unterbinden, böte der Einsatz von Aptameren. Dabei handelt es sich um kurze Nucleinsäuren, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur in der Lage sind, hochaffin und spezifisch an ihre Zielmoleküle zu binden. Die Bindung des Aptamers an das Zielprotein kann unter anderem zu dessen Inhibierung führen.

In dieser Arbeit wurden zwei DNA-Aptamere für E-Selektin, SDA1 und SDA2, in einem *in vitro* SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) selektiert, mit dem Ziel, die Interaktion zwischen E-Selektin und E-Selektin-Ligand präsentierenden Zellen zu blockieren. Es konnte mittels Filter-Retentions-Assay gezeigt werden, dass beide 91 Nucleotid langen DNA-Aptamere mit einer Dissoziationskonstante von

ca. 100 nM sowohl an E- als auch an P-Selektin binden. Auch die Bindung an murine Selektine konnte nachgewiesen werden. Der anti-adhäsive Effekt der Aptamere auf die Bindung zwischen E- und P-Selektin-Chimären und E- und P-Selektin-Ligand- (Sialyl-Lewis-X, Sialyl-Lewis-A) präsentierenden humanen Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zellen (HT29) wurde in einem statischen System mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Ebenfalls wurde in einem dynamischen System in einem laminaren Fluss-Assay unter physiologischen Scher-Bedingungen die Interaktion zwischen immobilisierten E- bzw. P-Selektin-Chimären und HT29-Zellen bzw. humaner eosinophiler Leukämiezelllinie EOL-1 mittels SDA1 und SDA2 inhibiert. Die Stabilität der Aptamere in Voll-Medium für mehr als zwei Stunden ermöglichte die Untersuchungen in *in vitro* Zellkultur-Modellen. Somit wurde zum Schluss die Interaktion zwischen TNF- α -stimulierten, E-Selektin-präsentierenden *human pulmonary microvascular endothelial cells* (HPMECs) und HT29-Zellen unter Scher-Bedingungen in einem laminaren Fluss-Assay mittels SDA1 bzw. SDA2 blockiert.

Zusammengefasst wurden in dieser Arbeit zwei E- und P-Selektin-spezifische DNA-Aptamere selektiert, welche in der Lage sind unter physiologischen Scher-Bedingungen die Interaktion zwischen E- und P-Selektin und dessen Liganden zu inhibieren. SDA1 und SDA2 sind somit potentielle neue therapeutische Wirkstoffe, die eventuell zur Verminderung der Selektin-vermittelten Adhäsion von Tumorzellen während der Metastasierung führen können.

In zukünftigen Untersuchungen sollte die Wirkung der Aptamere *in vivo* mit Hilfe eines Xenotransplantat-Modells des menschlichen Pankreas-Adenokarzinoms überprüft werden. Diesbezüglich sollte auch an der Erhöhung der Stabilität von SDA1 und SDA2 gearbeitet werden.

1 EINLEITUNG

1.1 SELEKTINE

Bevilacqua *et al.*¹ berichteten 1987 von einem Endothel-Leukozyten-Adhäsions-Molekül, das sie zwei Jahre später als Lektin-haltigen neutrophilen Rezeptor charakterisierten.² Im Jahr 1989 schrieben vier weitere Forschungsgruppen unabhängig voneinander über Glykoproteine in den Plasmamembranen der Endothelzellen, Blutplättchen (Thrombozyten) und den weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Lasky *et al.*³ und Siegelman *et al.*⁴ berichteten von einem, für die Adhäsion von Lymphozyten an das Endothelium und die damit verbundene Extravassation der Lymphozyten (*Lymphocyte-Homing*) verantwortlichen, Rezeptor, dessen Lektin-Domäne die Liganden-Bindung leitete. Johnston *et al.*⁵ sowie Larsen *et al.*⁶ entdeckten ein Membranprotein auf Thrombozyten und Endothelzellen, dem eine Beteiligung an der Zell-Adhäsions-Kaskade zugeschrieben wurde. Die drei heterophilen Adhäsions-Glykoproteine wurden aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu einer Familie zusammengefasst, der Selektin-Familie.⁷

1.1.1 STRUKTUR UND EXPRESSION DER SELEKTINE

Selektine sind langgestreckte, Kohlenhydrat-bindende, hauptsächlich im vaskulären System vorhandene Adhäsionsglykoproteine, die gemeinsame Domänenstrukturen aufweisen und eine Schlüsselrolle in der Adhäsionskaskade von Leukozyten einnehmen. Alle drei Selektine bestehen aus einer C-terminalen Calcium-abhängigen Lektin-Domäne (C-Typ Lektin-Domäne), einer EGF-ähnlichen Domäne (*Epidermal Growth Faktor-like domain*) und *short consensus repeats* (SCRs) gefolgt von einer transmembranen Region und einer C-terminalen zytoplasmatischen Region und werden, abhängig vom Zelltyp in dem diese vorkommen, in L- (Leukozyten), E- (Endothel) und P- (Platelet) Selektine unterteilt.⁸

Das humane P-Selektin (hP-Selektin) ist mit 830 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 140 kDa das größte Mitglied in der Selektin-Familie. Die zytoplasmatische Region wird von 35, die transmembrane Region von 24, die C-Typ Lektin-Domäne von 101 und die EGF-ähnliche Domäne von 37 Aminosäuren gebildet. 9 SCRs aus je 62 Aminosäuren sorgen für die Ausdehnung des P-Selektins in dem extrazellulären Raum. Zwölf potentielle Glykosylierungen und 23 Disulfidbrücken werden für das hP-Selektin beschrieben.

Das humane E-Selektin (hE-Selektin) besteht aus 612 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 115 kDa auf. 32 Aminosäuren bilden die zytoplasmatische- und 22 die transmembrane Region aus, während 118 Aminosäuren die C-Typ Lektin- und 36 die EGF-ähnliche Domäne ausbilden. Zudem besteht hE-Selektin aus 6 SCRs, die wie bei den anderen Selektinen aus 62 Aminosäuren bestehen und weist elf Glykosylierungen und 17 Disulfidbrücken auf.

Das kleinste Mitglied in der Selektin-Familie ist das von Leukozyten exprimierte humane L-Selektin (hL-Selektin) mit nur 372 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 74 kDa. Während, wie bei den anderen Selektinen auch, die transmembrane Region des L-Selektins aus 23 und die EGF-ähnliche Domäne aus 37 Aminosäuren besteht, bilden nur 17 Aminosäuren seine zytoplasmatische Region aus. Die C-Typ Lektin-Domäne des hL-Selektins wird, wie auch bei hP-Selektin, von 101 Aminosäuren ausgebildet. Mit nur zwei SCRs ist der extrazelluläre Anteil von hL-Selektin relativ klein. Dieses Selektin besitzt sieben potentielle Glykosylierungsstellen und neun Disulfidbrücken.

Zur Übersicht sind die unterschiedlichen Aminosäure-Sequenzlängen der humanen Selektine in Tabelle 1 zusammengefasst.

In allen Selektinen ist die C-Typ Lektin-Domäne für die Bindung des Kohlenhydrat-Liganden verantwortlich, wobei diese Interaktion von der Anwesenheit von Calcium-Ionen abhängig ist, was mit dem Zusatz C-Typ zum Ausdruck gebracht wird.⁹ Dabei ist die C-Typ Lektin-Domäne in den drei Selektinen bis zu 65% Sequenz-homolog. Dies erklärt auch die gleiche Affinität der Selektine für Sialyl-Lewis-Antigene.¹⁰ 1993 wurden die übereinstimmenden Liganden-Bindungs-Epitope für E- und P-Selektin beschrieben.¹¹ Die Kristallstruktur des E-Selektins wurde schließlich 1994 von Graves *et al.*¹² und die dem E-Selektin ähnliche Kristallstruktur des P-Selektins 2000 von Somers *et al.*¹³ aufgeklärt.

Tabelle 1: Aufteilung der Aminosäure- (AS) Sequenzlänge bei den humanen Selektinen in die jeweiligen Domänen.

	hP-Selektin	hE-Selektin	hL-Selektin
Sequenzlänge	830 AS	612 AS	372 AS
Zytoplasmatische Region	35 AS	32 AS	17 AS
Transmembranregion	24 AS	22 AS	23 AS
C-Typ Lektin-Domäne	101 AS	118 AS	101 AS
EGF-ähnliche Domäne	37 AS	36 AS	37 AS
SCRs	9 x 62 AS	6 x 62 AS	2 x 62 AS
Glykosylierungen	12	11	7
Disulfidbrücken	23	17	9

Die Selektine erstrecken sich durch die SCRs in den extrazellulären Raum, wobei die genaue Funktion der SCRs noch nicht geklärt ist. Es ist lediglich bekannt, dass P-Selektin bei einer Manipulation seiner SCR-Anzahl nicht mehr in der Lage ist, beim Lymphozyten-*homing* mitzuwirken.¹⁴ Die EGF-ähnliche Domäne, welche die für die Kohlenhydrat-Bindung zuständige C-Typ Lektin-Domäne von den SCRs trennt, wird eine Beteiligung an der Liganden-Bindung der Selektine zugeschrieben.¹⁵⁻¹⁸ Zusätzlich gibt es Studien, die die EGF-ähnliche Domänen bzw. SCRs für die Liganden-Spezifität der Selektine mitverantwortlich machen,^{19,20} wobei deren genaue Rolle noch nicht definiert werden konnte. Während die C-Typ Lektin-Domäne innerhalb der Selektin-Familie hochkonserviert ist, ist keine Homologie innerhalb der transmembranen und zytoplasmatischen Region der Selektine vorhanden.²¹

Die Kristallstruktur der Selektine zeigt eine globuläre C-Typ Lektin-Domäne mit einer flachen, auf der Oberfläche liegenden Liganden-Bindungstasche. Dabei können die Selektine jeweils nur mit einem Liganden interagieren.^{12,13} Abbildung 1 stellt schematisch die Domänenstruktur der Selektin-Familie dar.

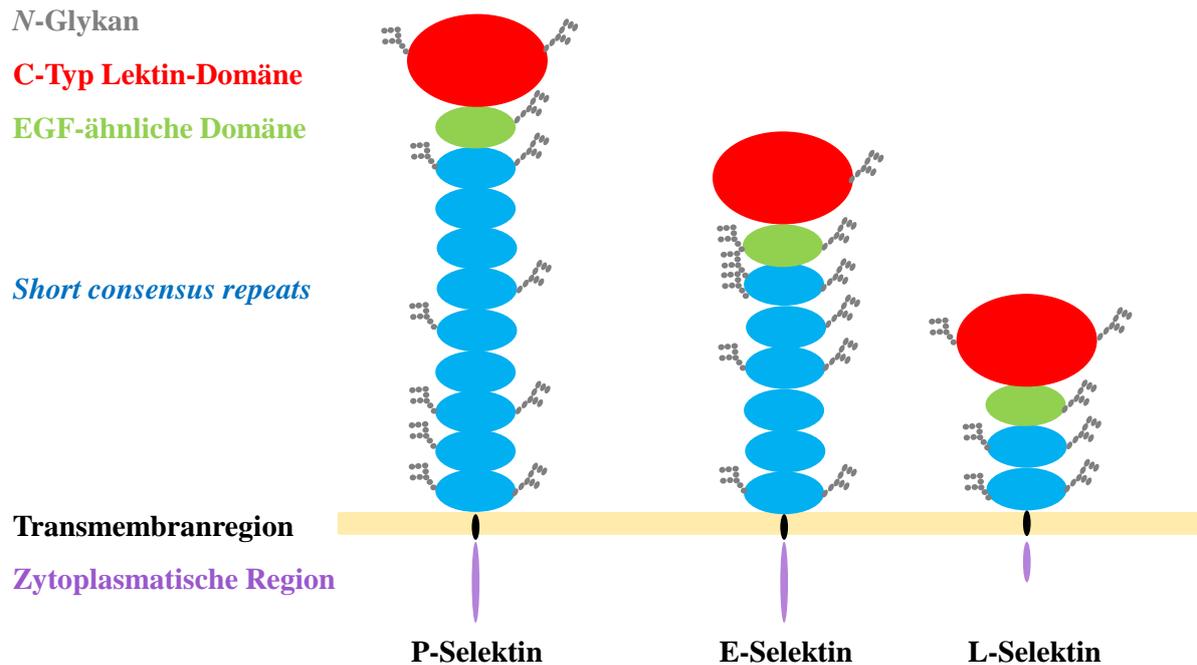


Abbildung 1: Darstellung der Domänenstruktur der Selektine. Alle drei Selektine weisen in ihren Domänenstruktur N-Glykane auf und setzen sich aus einer C-Typ Lektin-Domäne, EGF-ähnliche Domäne, *short consensus repeats* (SCR) sowie einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Region zusammen. Dabei unterscheiden sich die Strukturen hauptsächlich in der Anzahl der SCRs. P-Selektin besitzt 9, E-Selektin 6 und L-Selektin nur 2 SCRs.

In allen Arten ist die Funktion der Selektine identisch, während die Anzahl der Aminosäuren, die SCRs sowie die Anzahl der Glykosylierungen je nach Spezies zu unterscheiden sind. So bestehen zum Beispiel zwischen humanen und murinen L-Selektinen eine Aminosäure-Sequenzhomologie von 77% und eine 79%ige Übereinstimmung in der Nucleotid-Abfolge.²² In Tabelle 2 sind die prozentualen Homologien der Aminosäure-Sequenzen bei unterschiedlichen Selektinen in gleichen Spezies sowie bei gleichen Selektinen in unterschiedlichen Spezies aufgelistet.²³

Tabelle 2: Homologie der Selektine. Prozentuale Homologie der Aminosäure-Sequenzen bei unterschiedlichen Selektinen in gleichen Spezies sowie bei gleichen Selektinen in unterschiedlichen Spezies.

	Lektin-Domäne	EGF-ähnliche Domäne	SCRs	Transmembrane Region	Zytoplasmatische Region
Unterschiedliche Selektine, gleiche Spezies	52%	47%	35%	-	-
Gleiche Selektine, unterschiedliche Spezies	72%	60% (P > 90%)	40%	80% (L > 95%)	> 75%

Während L-Selektin konstitutiv auf der Oberfläche von den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) präsentiert wird, ist die Expression des E-Selektins von der Stimulation der Endothelzellen durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 oder Lipopolysaccharide (LPS) abhängig.²⁴ Die *de novo*-Synthese von E-Selektin erreicht nach ca. 4 - 6 Stunden ihr Maximum und ist nach ca. 12 - 24 Stunden zu Ende,^{22,25} so dass es dann mittels Endozytose ins Lysosom geleitet und dort abgebaut wird.²⁶

Ähnlich wie bei E-Selektin findet auch die *de novo*-Synthese von P-Selektin statt.²⁵ Zusätzlich dazu können Endothelzellen und Thrombozyten mittels Botenstoffen wie Histamin oder Thrombin stimuliert werden, so dass die in Endothelzellen synthetisierten, in Speichergranula von Thrombozyten und Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeicherten P-Selektine innerhalb von Minuten mobilisiert und auf die Zelloberfläche gebracht werden.^{22,25,27} Nach einer Verweildauer von ca. 60 Minuten werden die auf der Oberfläche präsentierten P-Selektine mittels Endozytose entweder in die Speichergranula zurück gebracht und dort gespeichert oder ins Lysosom überführt und dort abgebaut.²⁸

Somit ist P-Selektin aufgrund seiner schnellen Präsentation auf der Zelloberfläche für die Leukozyten-Adhäsion in der Frühphase der Entzündung zuständig. E-Selektin wiederum, welches wegen seiner *de novo*-Synthese später auf der Oberfläche präsentiert wird, ist für die Leukozyten-Adhäsion in der Spätphase der Entzündung verantwortlich. Dies führt zum Übergang der Leukozyten-Bindung zur festen Adhäsion.^{22,25} In Tabelle 3 sind Vorkommen sowie, die für die Expression notwendigen Zytokine bzw. Botenstoffe und die Selektin-Target-Zellen für die jeweiligen Selektine aufgeführt.

Tabelle 3: Selektin-Spezifitäten. Vorkommen der Selektine sowie die für die Aktivierung der Expression nötigen Zytokine und die Selektin-Target-Zellen.

	Zelle	Aktivierung	Target-Zelle
P-Selektin	Endothelzellen	Histamin, Thrombin, (ca. 10 min)	Monozyten
	Thrombozyten (Blutplättchen)	TNF- α , IL-1 (4-6 h)	Neutrophile
E-Selektin	Endothelzellen	TNF- α , IL-1 (4-6 h)	Neutrophile
L-Selektin	Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile	konstitutiv	Endothelzellen

1.1.2 SELEKTIN-LIGANDEN

Bei den Selektin-Liganden handelt es sich um langgestreckte, stark hydrophile Proteine, die über ihre Serin- und Threoninreste *O*-glykosidische und über Asparaginreste wenige *N*-glykosidische Kohlenhydrat-Verknüpfungen aufweisen. Da es sich dabei um Mucin-ähnliche Proteine mit fucosylierten und sialylierten Oligosaccharidmodifikationen handelt, werden die Selektin-Liganden auch Sialomucine genannt.²⁹ Dabei bindet das für die Kohlenhydratbindung zuständige Epitop der Selektine (C-Typ Lektin-Domäne) an die glykosidisch verknüpften Sialyl-Lewis-Antigene der Sialomucine. Bei diesen *O*-Glykanen handelt es sich um Tetrasaccharide, die aus *N*-Acetyllactosamin, Fucose, Galactose und *N*-Acetylneuraminsäure bestehen.

Sialyl-Lewis-X (sLe^X; Neu5Acα2,3Galβ1,4[Fucα1,3]GlcNAc-O-R) und dessen Positionsisomer Sialyl-Lewis-A (sLe^A; Neu5Acα2,3Galβ1,3[Fucα1,4]GlcNAc-O-R) sind die zwei häufigsten sialylierten und fucosylierten Oligosaccharide, die eine große Rolle bei Selektin-vermittelten Zell-Zell-Erkennungsprozessen spielen.^{29,30} Abbildung 2 zeigt die Molekülstruktur der beiden Positionsisomere.

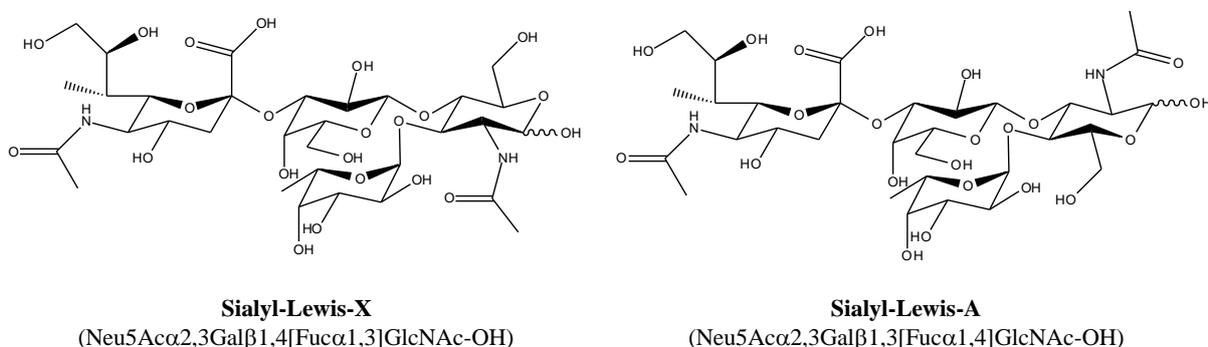


Abbildung 2: Molekülstruktur der Positionsisomere Sialyl-Lewis-X und Sialyl-Lewis-A. Das *O*-glykosidisch verknüpfte Tetrasaccharid Sialyl-Lewis-X und dessen Positionsisomer Sialyl-Lewis-A setzen sich aus α2,3 verknüpfter *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Acα2,3) und Galactose (Gal), welche β1,3 bzw. β1,4 (sLe^A bzw. sLe^X) an *N*-Acetylgalactosamin (GlcNAc-OH), welches wiederum α1,3 (sLe^X) bzw. α1,4 (sLe^A) mit Fucose (Fuc) verknüpft ist, zusammen.

Zu den E-Selektin Liganden gehören Glykoproteine E-SelektinLigand-1 (ESL-1) und P-Selektin-Glykoligand-1 (PSGL-1), welche von den hämatopoetischen Stammzellen präsentiert werden. P-Selektin und L-Selektin sind ebenfalls in der Lage an PSGL-1 zu binden. Zusätzlich interagiert L-Selektin mit den Adhäsionsmolekülen GlyCAM-1, CD34 und MAdCAM-1.³¹ Somit ist das PSGL-1 das einzig bekannte Glykoprotein, das mit allen drei Selektinen interagiert. Hierbei handelt es sich um ein langgestrecktes, über Disulfidbrücken

verknüpftes homodimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 230 kDa, welches eng benachbarte *O*-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratmodifikationen sowie sulfatierte Tyrosine aufweist.

Die Bindungsaffinität zwischen Selektinen und ihren Liganden wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben.³² Für die Bindung zwischen E-, P- und L-Selektin und dem löslichen *O*-Glykan sLe^X wurden Dissoziationskonstanten von 0,4, 1,0 und 0,6 mM ermittelt.^{33,34} Die Interaktion zwischen rekombinantem löslichen P-Selektin und dem löslichen Glykoprotein PSGL-1 wird mit Dissoziationskonstanten von 2 bzw. 44 nM beschrieben.³⁵ Für die Bindung des rekombinanten löslichen P-Selektins mit P-Selektin-Liganden auf der Oberfläche von humanen Neutrophilen wurde einer Dissoziationskonstante von ca. 1,5 nM berechnet.³⁶ Hierbei wird das Vorhandensein von sulfatierten Tyrosinen innerhalb der ersten 20 N-terminalen Aminosäuren des PSGL-1 für die ca. 50-fach stärkere Bindung zwischen PSGL-1 und P-Selektin im Vergleich zu der Bindung zwischen PSGL-1 und E-Selektin mitverantwortlich gemacht.^{34,37,38} Während die Anwesenheit von Sulfatmolekülen innerhalb der Glykoproteinliganden keinen Einfluss auf den Bindungscharakter des E-Selektins besitzt, optimiert das Vorhandensein von Sulfaten die Bindung von P- und L-Selektinen zu den sulfatierten Glykoproteinliganden.^{13,30,38} Zum Beispiel bindet Heparin, welches Sulfatmodifikationen besitzt, an P- und L-Selektin, jedoch nicht an E-Selektin.⁸

Die insgesamt als schwach charakterisierte Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden ist die Folge der Dissoziation und Assoziation der Bindung zwischen Selektinen und Selektin-Liganden, während die Leukozyten auf den Endothelzellen „rollen“.³⁹ Abbildung 3 stellt graphisch die auf der Oberfläche von Zellen präsentierten Selektine und dessen Glykoproteinliganden dar.

Während sich die Interaktionspartner im Fall des E- und P-Selektins auf unterschiedlichen Zellen befinden, führt die Anwesenheit von L-Selektin und PSGL-1 auf der Oberfläche von Leukozyten zu homotypischer Adhäsion der Leukozyten untereinander (Abbildung 3).

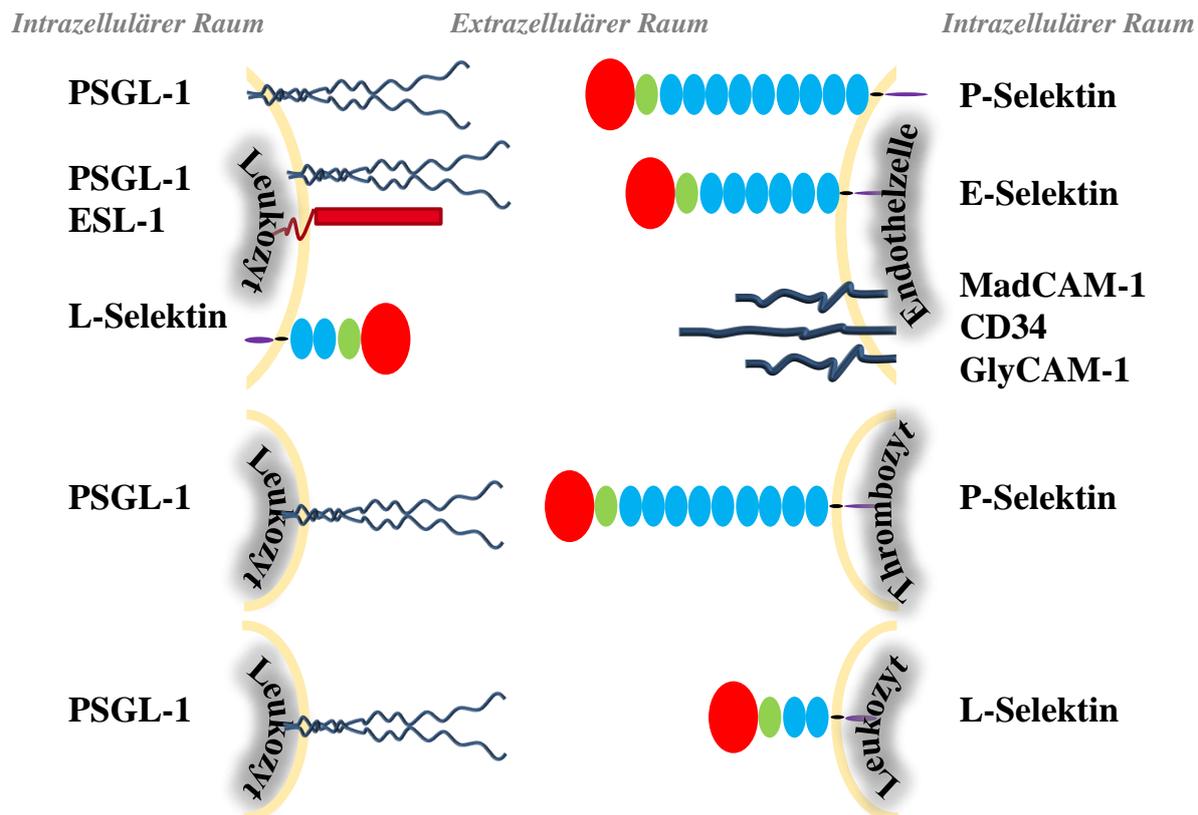


Abbildung 3: Selektine und ihre Liganden. Dargestellt sind die von den Endothelzellen präsentierenden E- und P-Selektine sowie MadCAM-1, CD34 und GlyCAM-1. Ebenfalls sind die, von den Thrombozyten präsentierenden P-Selektine und von den Leukozyten präsentierenden L-Selektine, PSGL-1 und ESL-1 dargestellt.

1.1.3 PHYSIOLOGIE DER SELEKTINE UND DER TRANSENDOTHELIALEN MIGRATION

Bei den Selektinen handelt es sich um Oberflächen-Adhäsionsproteine, welche die Bindung von Leukozyten an das vaskuläre Endothel vermitteln und somit für den initialen Schritt in der transendothelialen Migration der Leukozyten (auch Leukozyten-Extravasation, Leukozyten-Migration oder *Lymphozyten-homing* genannt) verantwortlich sind. Ihre Funktion besteht im Abbremsen der in postkapillaren Venolen fließenden Leukozyten und deren transiente Adhäsion an die Endothelzellen im Fall einer Endzündungsreaktion. Dabei binden die von der Oberfläche der Endothelzellen langgestreckten E- und P-Selektine unter in postkapillaren Venolen herrschenden schwachen Scher-Bedingungen an den von den Leukozyten präsentierten Liganden. Die transendotheliale Migration von Leukozyten wird somit von E- und P-Selektine initiiert.⁸

In Abbildung 4 ist der Prozess der transendothelialen Migration von Leukozyten graphisch dargestellt. Bei einer Entzündungsreaktion werden die für die Entzündung verantwortlichen Pathogenen von aktivierten Makrophagen phagozytiert. Dies hat die Ausstoßung von Zytokinen wie IL-1 und TNF- α und Chemokinen aus den aktivierten Makrophagen zur Folge (Abbildung 4 A).⁴⁰ Während die Chemokine direkt auf die über den Entzündungsherd liegenden Endothelzellen transportiert werden und dort an den Chemokin-Rezeptoren binden, aktivieren Zytokine wie zum Beispiel IL-1 und TNF- α in den Endothelzellen die Synthese von E- und P-Selektinen wie auch von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM (*intercellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) und PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*). Die Bindung zwischen den Leukozyten-präsentierten E- und P-Selektin-Liganden und L-Selektin und den Endothelzell-präsentierten E- und P-Selektinen und L-Selektin-Liganden führt zur Abbremsung der fließenden Leukozyten und wird als *primary capture* bezeichnet (Abbildung 4 B (1)). Dies führt zur Rekrutierung von Leukozyten am Ort der Entzündung und ist somit, wie oben schon erwähnt, der initiale Schritt bei der transendothelialen Migration. Die nachkommenden Leukozyten können teilweise durch ihre Adhäsion an den adhären Leukozyten mit den Endothelzellen in Kontakt kommen (*secondary capture*), was zu einer Akkumulation von Leukozyten führt.^{41,42} Die Selektin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten an das Endothelium aktiviert die Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche von den Leukozyten (Abbildung 4 B (2)). Die Bindung zwischen den Chemokin-Rezeptoren auf der Leukozytenoberfläche und die an den Chemokin-Rezeptoren gebundenen Chemokine auf der Oberfläche der Endothelzellen führt durch Chemokin-vermittelte Signaltransduktion zur Aktivierung der Leukozyten-Integrine (Abbildung 4 B (3)).⁴³ Die Bindung zwischen aktiven Intergrinen auf der Oberfläche der Leukozyten und den Integrin-Liganden wie ICAM, VCAM und PECAM-1 auf der Oberfläche von den Endothelzellen führt wiederum zu einer festen Bindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Abbildung 4 B (4)).^{40,44-46}

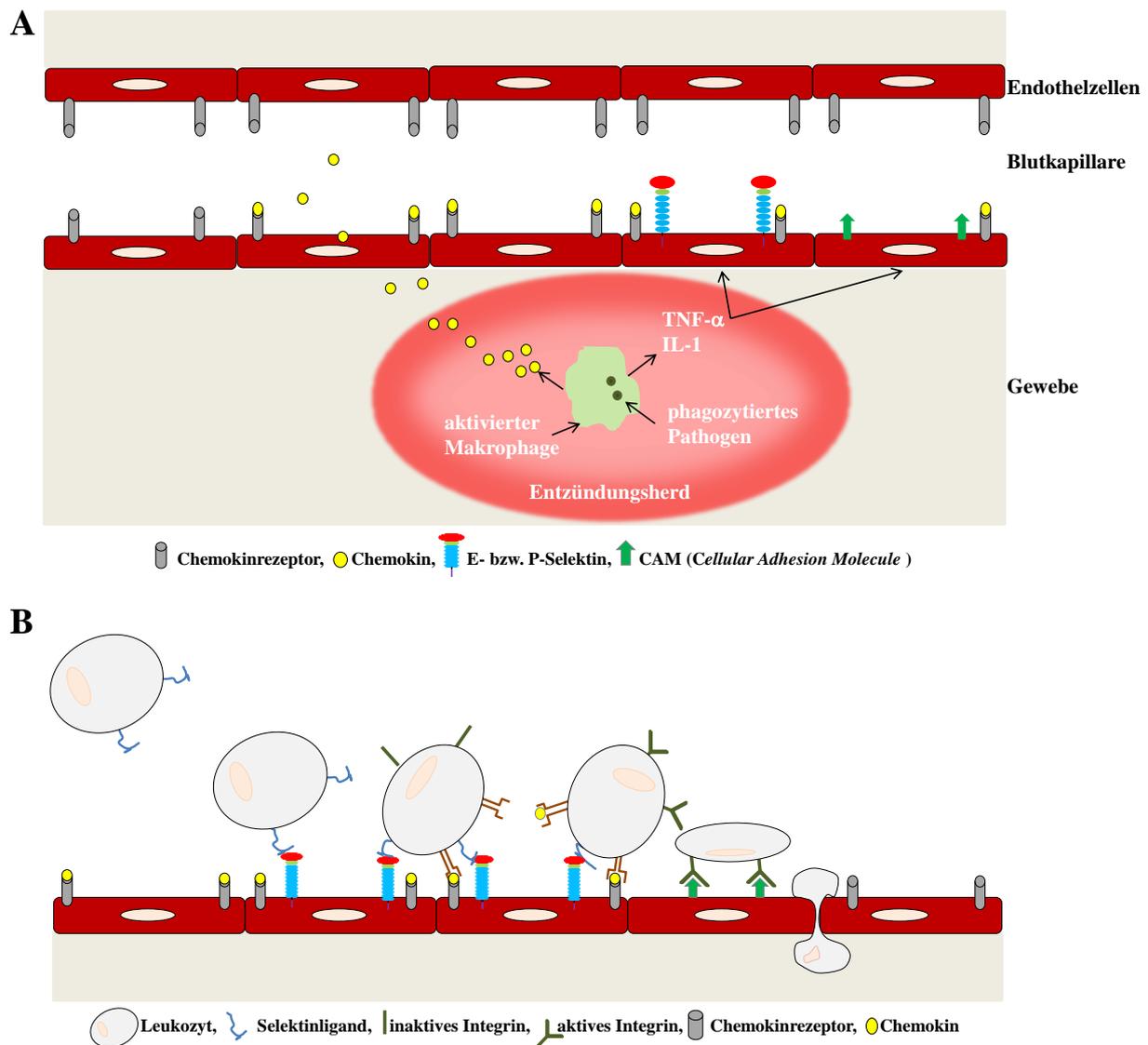


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Protein-Produktion bei einer Entzündungsreaktion und der transendothelialen Migration von Leukozyten. (A) Bei einer Entzündungsreaktion werden die Pathogene von den Makrophagen phagozytiert. Die von den aktivierten Makrophagen ausgestoßenen Chemokine binden an die Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche der Endothelzellen. Das ebenfalls ausgestoßene TNF- α und IL-1 leiten die Synthese von E- und P-Selektinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen (CAM) ein. (B) Die Bindung zwischen E- bzw. P-Selektin Liganden auf der Oberfläche von Leukozyten und E- bzw. P-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen führt zur Adhäsion der Leukozyten (1) und Aktivierung der Leukozyten-Chemokinrezeptoren (2). Dadurch erfolgt in den Leukozyten die Aktivierung von Integrinen (3). Die Interaktion der aktivierten Integrine mit CAM, die auf den Endothelzellen präsentiert werden, führt zu einer festen Bindung der Leukozyten an das Endothelium(4). Schließlich dringen die fest auf den Endothelzellen gebundenen Leukozyten das unter den Endothelzellen liegende Gewebe (5).

Schließlich löst unter anderem die Bindung zwischen Leukozyten-Integrinen und PECAM-1 die durch PECAM-1 existierende homogene Bindung zwischen den Endothelzellen auf. Dies ermöglicht die Transmigration der Leukozyten und deren Austreten aus den Blutkapillaren und Eindringen in die darunterliegenden Gefäße (Diapedese, Abbildung 4 B (5)).^{47,48}

Die Rolle der Selektine in der transendothelialen Migration von Leukozyten spielt somit eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Entzündungen. Folglich hat die Abwesenheit von Selektinen oder Selektin-bindenden-Liganden den Ausfall der effektiven Rekrutierung der gegen Entzündungserregern gerichteten Neutrophilen zur Folge.⁴⁹⁻⁵¹

1.1.4 PATHOLOGISCHE WIRKUNG DER SELEKTINE UND DIE METASTASIERUNG

Während die Abwesenheit von Selektinen im Fall einer Entzündung ein Neutrophilen-Mangel am Entzündungsort zur Folge hat, führt die Überexpression von E- und P-Selektin zu unerwünschten Auswirkungen, die einer Pathogenese beisteuern.

Für viele auf Entzündung basierenden Erkrankungen wie zum Beispiel Arteriosklerose und Thrombose werden die Selektine bzw. die durch die Selektine vermittelte Ansammlung von Leukozyten nachweislich für die Krankheit mitverantwortlich gemacht.⁵²⁻⁵⁴ Die durch Anhäufung von cholesterolreichen Lipoproteinen in den Gefäßen ausgelöste Entzündung bei Arteriosklerose verursacht eine Selektin-vermittelte Monozyten-Rekrutierung. Dabei werden die Lipoproteine von den Monozyten aufgenommen und oxidiert. Diese unkontrollierte Reaktion führt zu Elastizitätsverlust der Arterien und folglich zur Arteriosklerose. Die als Thrombose bezeichnete Gefäßerkrankung wird mit einer erhöhten Präsentation von P-Selektin erklärt. Dabei entstehen durch die Interaktion zwischen überproduzierten P-Selektinen, die auf der Oberfläche von Thrombozyten präsentiert werden und PSGL-1, der von den Leukozyten präsentiert wird, Aggregate, die zu Blutgerinnseln in den Arterien führen.⁵⁵

Zusätzlich zu den Entzündungserkrankungen werden E- und P-Selektine für die Metastasierung von Tumorzellen mitverantwortlich gemacht.⁵⁶⁻⁵⁸ Bei der hämatogenen Metastasierung dringen die, von dem primären Tumor abgelösten Tumorzellen durch die Basalmembran (Invasion) und gelangen durch das angrenzende Bindegewebe in die Blutbahn (Intravasation). Sie können sich so im Körper fortsetzen und fortpflanzen. Am Ort der zukünftigen Metastasierung angekommen adhären die zirkulierenden malignen Zellen über ihre Sialyl-Lewis-Antigen-modifizierte Mucine an E- und P-Selektine und imitieren das Verhalten von Leukozyten bei entzündungsgesteuerter Selektin-vermittelter Leukozytenmigration.⁵⁹ Durch die Selektin-vermittelte Adhäsion von Tumorzellen an den Endothelzellen wird die Extravasation der Tumorzellen aus den Venolen eingeleitet. Dadurch

passieren die Tumorzellen den Raum zwischen den Endothelzellen und dringen in die darunterliegenden Gefäße.^{35,36,59} Sind die zirkulierenden Tumorzellen am neuen Ort angekommen, findet die Besiedlung (Kolonisation) von neuen Organen und Gefäßen durch die Tumorzellen statt (Abbildung 5).

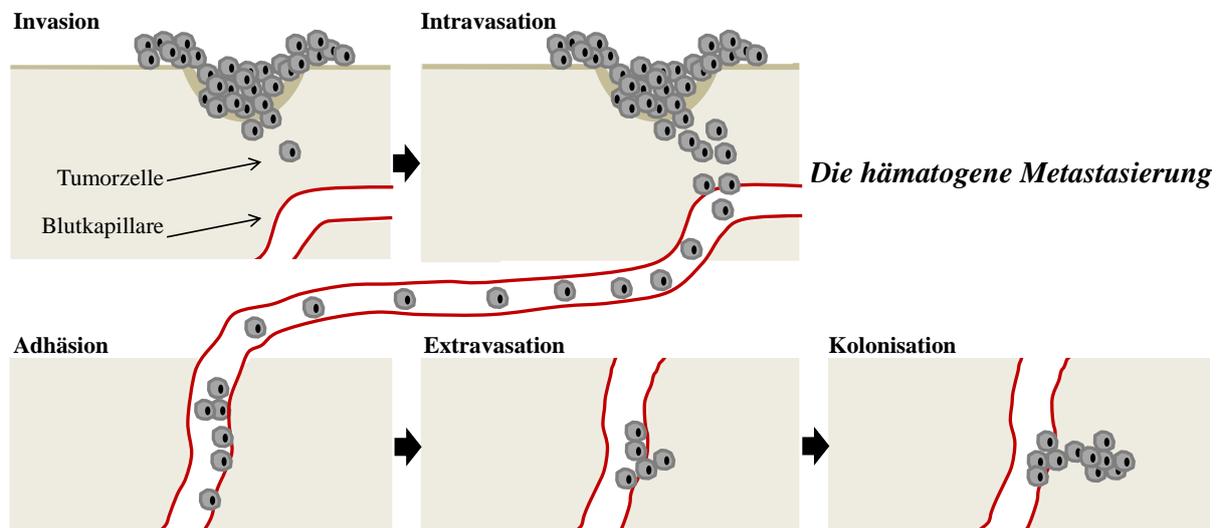


Abbildung 5: Darstellung der hämatogenen Metastasierung. Die sich von dem primären Tumor ablösenden Tumorzellen passieren die Basalmembran (Invasion) und gelangen in die Blutbahn (Intravasation). Am neuen Ort angekommen, adhären die zirkulierenden Tumorzellen über ihre Sialyl-Lewis-Antigen-modifizierten Mucine an den von den Endothelzellen präsentierten E- und P-Selektinen (Adhäsion) und gelangen schließlich in das unter den Endothelzellen liegende Gewebe (Extravasation) und kolonisieren (Kolonisation).

Die zirkulierenden Tumorzellen können auch durch Interaktion mit Thrombozyten die Barriere des Endotheliums durchqueren und aus der Blutbahn extravasieren.⁶⁰ Während die zirkulierenden Tumorzellen ihre Resistenz in der Blutbahn durch Bildung von Tumoraggregaten erhöhen, können sie sich auch durch Interaktion mit Thrombozyten eine Art Maske anlegen. Somit sind die in den Blutkapillaren zirkulierenden Tumorzellen nicht nur gegen natürliche Killerzellen geschützt, sondern können auch die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten über die von den Thrombozyten präsentierten P-Selektine und die von den Leukozyten präsentierten PSGL-1 zusätzlich zu ihrem Schutz ausnutzen. Die Bindung zwischen den zirkulierenden Tumorzellen und Thrombozyten und die durch die Thrombozyten an den Tumorzellen gebundenen Leukozyten ermöglichen die Extravasation der zirkulierenden Tumorzellen über die Thrombozyten und Leukozyten. Diese Art der Metastasierung scheint organspezifisch zu sein, so wurde sie in der Lunge, jedoch nicht in der Leber beobachtet.⁶⁰

Neuere Studien belegen, dass nicht bei allen Metastasierungen die Selektine eine essenzielle Rolle spielen. In einem Xenotransplantat-Modell des menschlichen Pankreas-

Adenokarzinoms führte die Abwesenheit von E- und P- Selektine zu einer 85%igen Reduktion von Peritonealkarzinomatose.⁶¹ Ebenso konnte in einem eosinophilen und chronischen myeloischen Leukämie Xenograftmodell⁶² sowie in einem kolorektalen Karzinom-Modell⁶³ eine ähnliche Reduktion der Metastasierung beobachtet werden. Lange *et al.* zeigten wiederum die Selektin-unabhängige Metastasierung von humanem Prostatakrebs.⁶⁴ Auch Schwankhaus *et al.* beobachteten die Selektin-unabhängige Streuung der Neuroblasten-Zellen LAN 1 und SK-N-SH. Dabei ermöglichten vielmehr die anderen Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel die Integrine, die transendotheliale Migration der Zellen.^{59,65}

1.2 SELEKTIN-RELEVANTE THERAPIEANSÄTZE

Die nachweisliche Beteiligung von E- und P-Selektinen an der Metastasierung führte zur Entwicklung von unterschiedlichen Strategien zur Bekämpfung von Selektin-vermittelter Pathogenese.³⁹ Alle entwickelten und durchgeführten Strategien haben die Inhibition der Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden zum Ziel. Dabei kommen unter anderem drei Molekülklassen infrage. Zum einen sind dies die aus Nucleinsäuren bestehenden Aptamere, zum anderen die aus Polysacchariden bestehenden Glycomimetica sowie die aus Proteinen bestehenden Antikörper. Dabei verhindern diese Moleküle die Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Liganden.

Das körpereigene Polysaccharid Heparin wird seit längerem aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf Selektine und Integrine als Blut-Gerinnungshemmer verwendet.⁶⁶ Die mittels Heparin verursachte Inhibition der Zell-Adhäsion und damit eventuell verbundene Anti-Metastase-Wirkung wird in prä-klinischen Studien untersucht.⁶⁶ Das Glycomimeticum Cylexin (CY-103), welches ein Sialyl-Lewis-X Analogon darstellt, blockiert durch seine Bindung an Sialyl-Lewis-X die Leukozyt-Endothelium-Interaktion.⁶⁷ Die ersten durchgeführten medizinischen Studien mit Cylexin zur Verhinderung der mit einer Wiederdurchblutung verbundenen Lungenschädigung nach einer Thrombendariektomie zeigte erste Erfolge.⁶⁸ Ebenfalls in prä-klinischen Studien befindet sich das P-Selektin-bindende Molekül PSI-697, welches als Entzündungs- und Thrombose-Hämmer gehandelt wird und der Pan-Selektin Antagonist GMI-1070, welcher zur Behandlung von Sichelzellenanämie eingesetzt werden soll.^{69,70} Ebenfalls wurde das P-Selektin RNA-Aptamer ARC5690 als eine Alternative zur Bekämpfung von Sichelzellenanämie selektiert und erfolgreich *in vivo* getestet.⁷¹

Zusätzlich zu der Strategie der Inhibition der Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Liganden mittels Inhibitoren wurden Moleküle zur Inhibition der Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM and VCAM entwickelt.³⁹ Somit soll die unerwünschte Leukozyten-Migration bei zum Beispiel Lungen-Transplantationen verhindert werden. Dabei wird die Präsentation von, für die Migration notwendigen, Adhäsions-Molekülen auf den Endothelzellen durch die Inhibition der Expression blockiert. Als Beispiel kann die Hemmung des Transkriptionsfaktors NFκB genannt werden, welcher unter anderem die Genexpression von E- und P-Selektin kontrolliert. Hierbei wird durch Bindung von Glucocorticoiden an NFκB dieser gehemmt und folglich die Transkription der Selektin-Gene verhindert.³⁹

1.3 APTAMERE

Kurze Nucleinsäuren (12 - 100 nt, ssDNA bzw. ssRNA), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur mit bestimmten Target-Molekülen wie zum Beispiel Proteinen oder organischen Farbstoffen hochaffin interagieren können, werden als Aptamere bezeichnet (*aptus* [lat.] = passen; *meros* [gr.] = Teilchen).⁷²

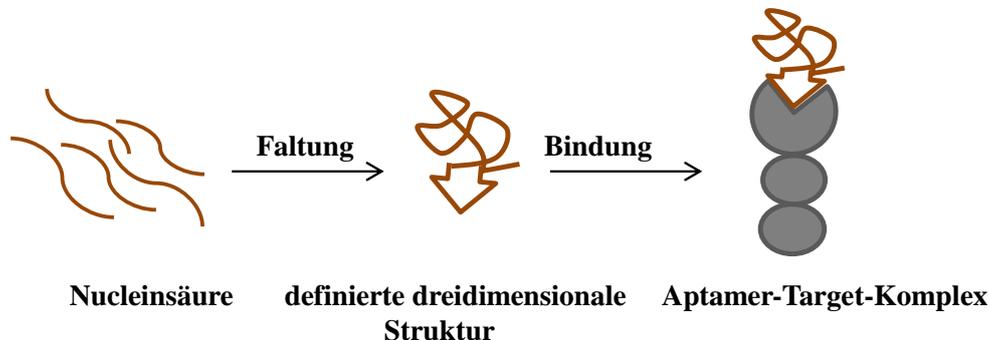


Abbildung 6: Darstellung eines Aptamer-Target-Komplexes. Einzelsträngige Nucleinsäuren können eine definierte dreidimensionale Struktur besitzen, weshalb sie hochspezifisch und hochaffin mit Zielmolekülen interagieren können.

Während kleine Zielmoleküle von den Aptameren umringt werden können, findet die Wechselwirkung zwischen Aptameren und Makromolekülen meistens über einzelne Epitope des Zielmoleküls statt (Abbildung 6). Die Interaktionen basieren hauptsächlich auf Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen. Dabei liegen die Dissoziationskonstanten für gute Interaktionspartner im pico- bis mikromolaren Bereich.

1.3.1 IN VITRO SELEKTION VON APTAMEREN

Aptamere werden in einem *in vitro* Verfahren namens SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) selektiert, welches im Jahr 1990 von Ellington und Szostak,⁷³ Tuerk und Gold⁷⁴ sowie Robertson und Joyce⁷⁵ entwickelt wurde. Dabei wird ausgehend von einer Nucleinsäure-Bibliothek mit ca. 10^{14} bis 10^{15} randomisierten Individuen die Nucleinsäure bzw. Nucleinsäuren selektiert und amplifiziert, die eine für die Target-Bindung geeignete dreidimensionale Faltungsstruktur ausbilden. Je nach Zielmolekül benötigt ein SELEX-Prozess 10 - 20 Selektionsrunden (Abbildung 7). Um aus der angereicherten Nucleinsäure-Bibliothek die selektierten Aptamere zu identifizieren, erfolgt meistens eine Klonierung und Sequenzierung.^{76,77} Mittlerweile kann statt einer aufwändigen Klonierung direkt ein Sequenzierungsschritt durchgeführt werden.⁷⁸

Mittels *next generation sequencing* kann eine Nucleinsäure-Bibliothek in ihrer gesamten Vielfalt sequenziert werden. Dabei werden Nucleinsäuren denaturiert und die einzelnen Stränge an immobilisierte Primer hybridisiert. Der Gegenstrang wird mit fluoreszenzmarkierten dNTPs aufgefüllt, digital registriert und anhand der spezifischen Fluoreszenz der eingebauten dNTPs die Nucleinsäuresequenz ermittelt.

Es wurden verschiedene Strategien zur Selektion von Aptamer-Target-Komplexen während eines SELEX-Prozesses entwickelt. Zum Einsatz kamen Nitrocellulose-Membranen, *Magnetic Beads*, Gel-Filtrations- und Affinitätschromatographie, sowie die Kapillarelektrophorese in der sogenannten CE-SELEX. In letzter Zeit wurden bei bestimmten Fragestellungen auch intakte Zellen als Target verwendet (*Cell-SELEX*).⁷⁹ Hierbei ist das Grundprinzip der SELEX unverändert und die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich nur in der Methode der Target-Immobilisierung sowie der Separation, der an das Target-Molekül gebundenen von den ungebundenen Nucleinsäuren.

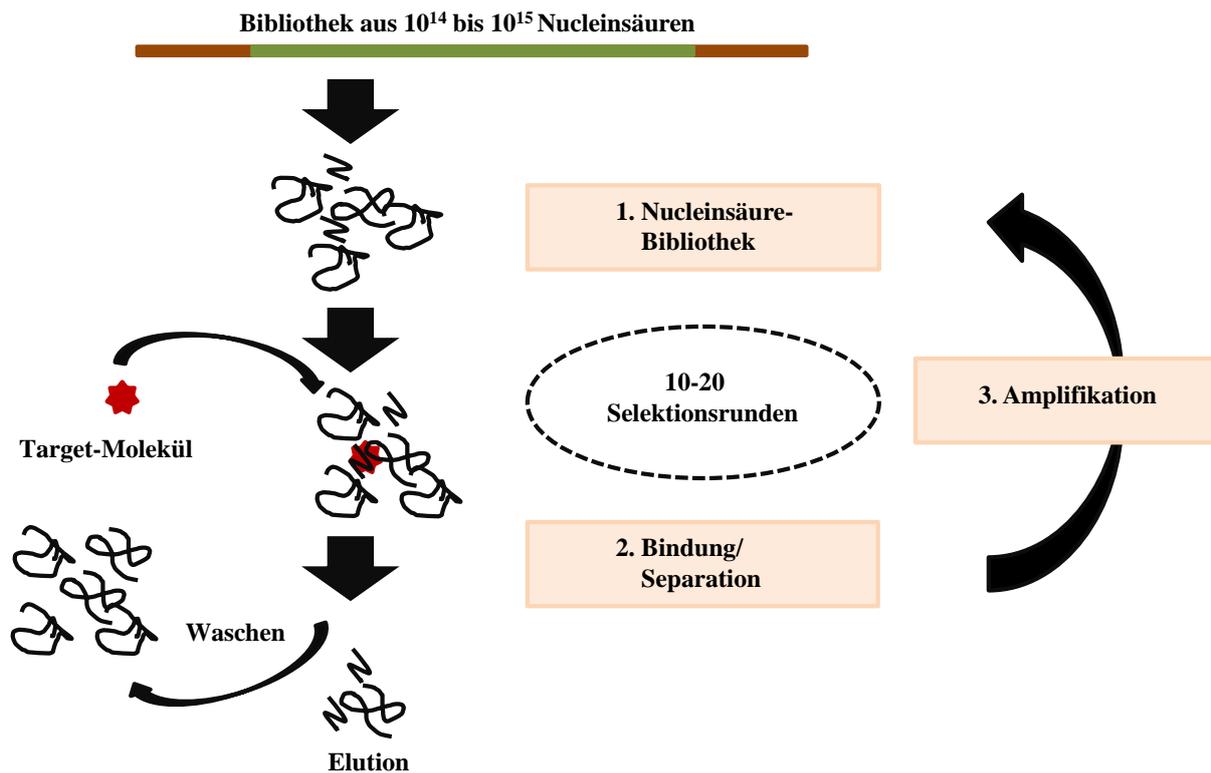


Abbildung 7: Darstellung des SELEX-Prozesses. Ausgehend von einer Nucleinsäure-Bibliothek werden die an das Target-Molekül bindenden Nucleinsäuren von den nicht-bindenden Nucleinsäuren separiert, amplifiziert und in der nächsten Selektionsrunde eingesetzt.

1.3.2 APTAMERE IM VERGLEICH ZU ANTIKÖRPERN UND GLYCOMIMETICA

Die Eigenschaft, spezifisch und hoch affin an Zielmoleküle zu binden, ist nicht nur auf Aptamere beschränkt, sondern auch Antikörper und Glycomimetica sind dazu in der Lage. Dabei besitzen alle drei genannten Molekül-Klassen unterschiedliche Vor- und Nachteile.

Der Vorteil von unter anderem aus Zuckerbausteinen aufgebauten Glycomimetica besteht in ihrer Strukturvorhersage. Jedoch sind der relativ komplexe Syntheseweg und die hydrolytische Labilität der Glycomimetica von Nachteil.

Auch Aptamere und Antikörper besitzen Vor- und Nachteile, welche in den Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst sind.⁸⁰

Tabelle 4: Vor- und Nachteile von Antikörpern.

Vorteile	Nachteile
	Herstellung in einem biologischen System; eventuelle bakterielle Kontamination
	Herstellung in größerem Maßstab aufwändig, Reinigung ist langwierig
	Immunogenität
Lange Halbwertszeit; werden aufgrund ihrer Größe nicht von der Niere abgebaut	Relativ groß und somit nicht in allen biologischen Systemen zugänglich
	Irreversible Denaturierung
Resistent gegen Nuclease-Degradation	Temperatur-labil
	Chemische Modifikationen sind nicht einfach durchführbar

Tabelle 5: Vor- und Nachteile von Aptameren.

Vorteile	Nachteile
Einfache <i>in vitro</i> Selektion ohne bakterielle Kontamination	
Herstellung in großem Maßstab bei hoher Reinheit	
Keine Immunogenität	
Relativ klein und somit in vielen biologischen Systemen zugänglich	Kurze Halbwertszeit; werden aufgrund ihrer Größe leicht von der Niere abgebaut
Reversibel denaturierbar	
Phosphordiesterbindung verursacht chemische Stabilität	Unmodifiziert werden sie im Serum degradiert
Einfach chemisch modifizierbar	

Zur Überwindung der Nachteile von Aptameren wurden verschiedene Strategien entwickelt. So erhöhen chemische Modifikationen der Nucleinsäuren die Nuclease-Resistenz und chemische Modifikation des 3'- bzw. 5'-Endes des Aptamers mit Konjugaten wie Polyethylenglykol oder Cholesterol die Halbwertszeit der Aptamere.

1.3.3 APTAMERE IN DER ANWENDUNG

Die Interaktion zwischen Aptameren und ihren Zielmolekülen kann zu unterschiedlichen Effekten führen, welche in der Medizin oder in der Molekularbiologie Anwendung finden. Abbildung 8 stellt mögliche Folgen graphisch dar, die durch die Bildung eines Aptamer-Target-Komplexes entstehen können.⁷²

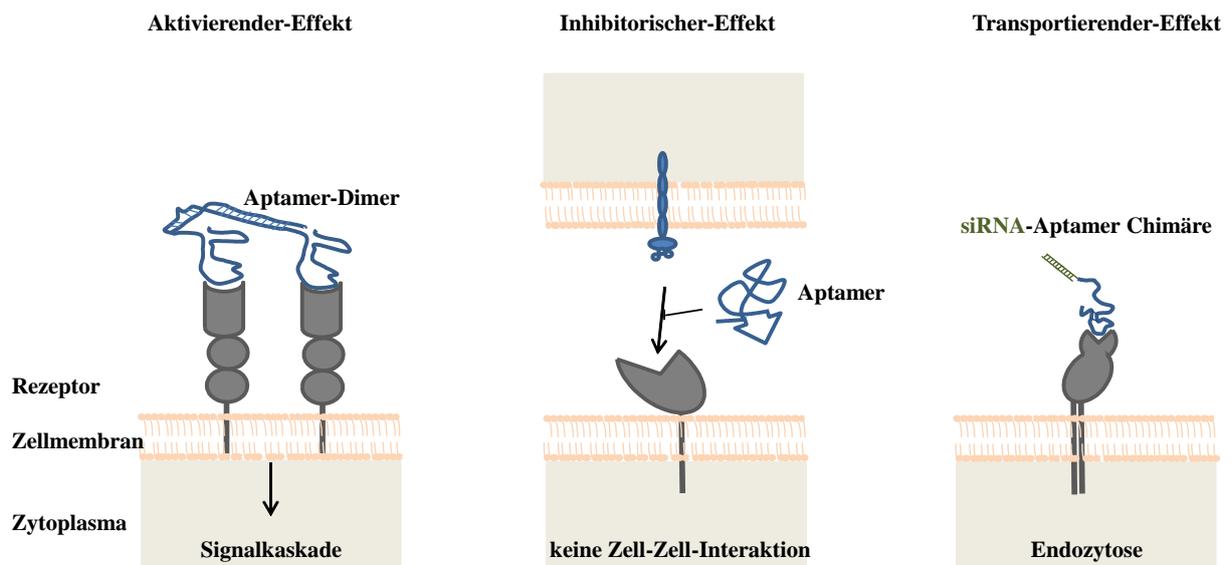


Abbildung 8: Darstellung der möglichen Effekte durch die Bindung des Aptamers an sein Zielprotein. Die Interaktion von einem Aptamer-Dimer mit zwei membranständigen Proteinen kann zur Auslösung einer Signalkaskade innerhalb der Zelle führen (Aktivierender-Effekt). Auch ein inhibitorischer Effekt kann die Bindung eines Aptamers an sein Zielprotein mit sich bringen. Mittels Aptameren, die mit den gebundenen Zielproteinen endozytiert werden, können auch andere Stoffe mit in die Zelle transportiert werden (Transportierender Effekt).

Führt die Bindung des Aptamers zu einem Funktionsverlust des Targetsmoleküls, kann das Aptamer als Inhibitor verwendet werden. Beeinflusst das Aptamer das Zielmolekül durch seine Bindung nicht, kann das Aptamer zur Detektion bzw. Verfolgung des Zielmoleküls eingesetzt werden. Kann das Aptamer durch die Bindung an das Target-Molekül zum Beispiel durch Endozytose in das Innere der Zellen gelangen, findet es als Transporter von anderen Stoffen, wie beispielweise Therapeutika, seine Anwendung.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, besitzen Aptamere ein breites Anwendungsspektrum. Sie werden sowohl in der Medizin als Therapeutika verwendet, als auch in der Molekularbiologie als molekulare Werkzeuge, zum Beispiel bei der Affinitäts-Reinigung.

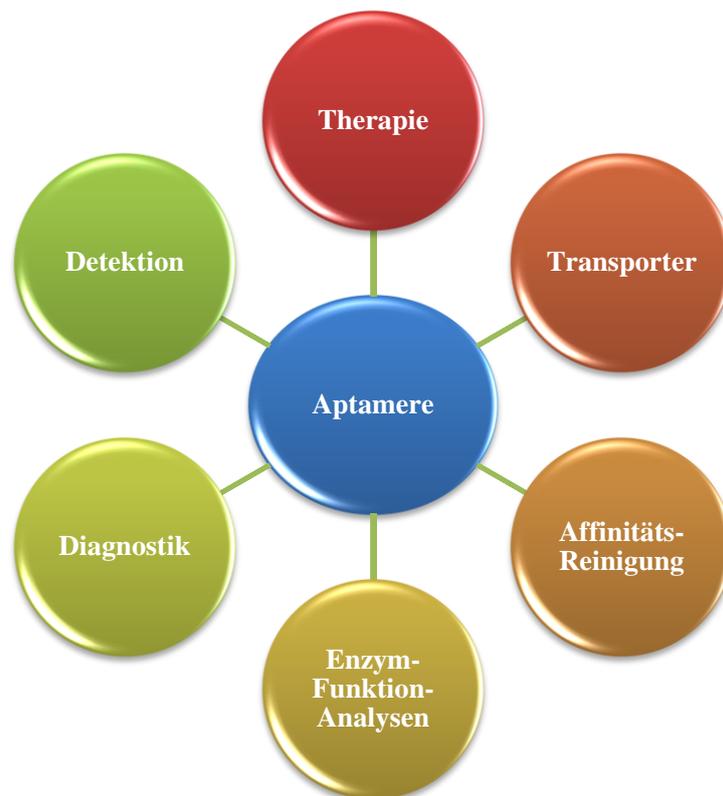


Abbildung 9: Anwendungsgebiete von Aptameren.

Schon seit Jahren werden mindestens drei Aptamere als Medikamente in der Medizin eingesetzt.⁷⁹ Das von Lee *et al.* 2008 beschriebene 2'-Fluoro-2'-O-Methyl-modifizierte RNA-Aptamer, genannt Macugen, ist das erste medizinisch eingesetzte Aptamer, das den Wachstumsfaktor VEGF bindet und zur Bekämpfung der altersbedingten Makula-Degeneration eingesetzt wird.⁸¹ Rusconi *et al.* veröffentlichten 2002 das von ihnen selektierte 2'-Fluoropyrimidin-Aptamer Anti-FIXa, welches zurzeit unter dem Namen REG1 als Gerinnungsfaktor IXa-spezifisches Aptamer in der Behandlung von Blutgerinnungen Anwendung findet.⁸² Ebenfalls als zugelassenes Medikament findet das TLR-9-spezifische DNA-Aptamer APG7909 bzw. IMO2055 als Anti-Krebs-Reagenz Verwendung.⁷⁹

1.4 ZIELSETZUNG

E- (Endothel) und P- (Platelet) Selektine spielen im initialen Schritt der Metastasierung eine entscheidende Rolle. Sie sind wichtige Andockstellen für Tumorzellen. Diese zu blockieren könnte ein erster Schritt zur Unterdrückung der Ausbreitung von Krebs im Organismus sein. Hierzu wären unterschiedliche Ansätze denkbar. Ein solcher Ansatz wäre der Einsatz von

Aptameren, hochspezifischen Nucleinsäure-Molekülen. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Selektion von Selektin-inhibierenden DNA-Aptamere.

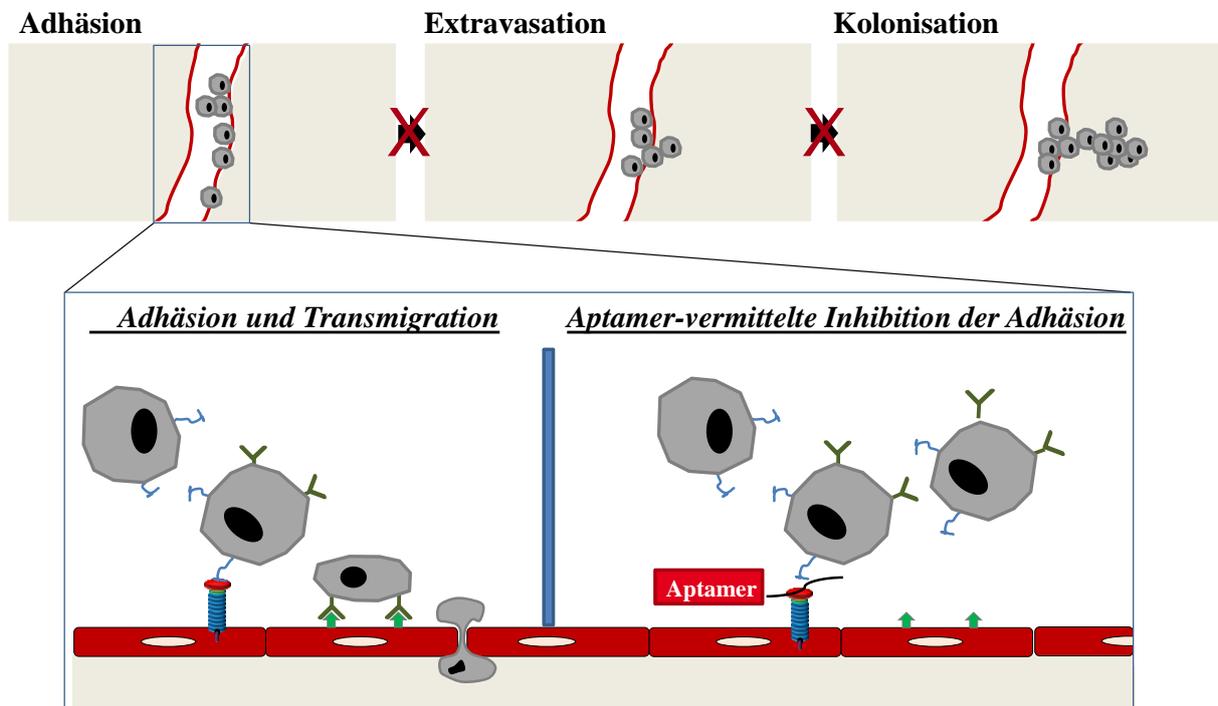


Abbildung 10: Modell der Metastasierung und des Einflusses von E-Selektin-bindenden DNA-Aptameren. Zirkulierende Tumorzellen können sich über ihren Liganden an die von den Endothelzellen präsentierten E- und P-Selektine anheften (Adhäsion). In der Folge können die Tumorzellen in das unter den Endothelzellen liegende Gewebe gelangen (Extravasation) und dort kolonisieren (Kolonisation). Wird die Interaktion der Selektine und ihrer Liganden mittels Aptameren inhibiert, kann keine Extravasation der Tumorzellen und somit auch keine Kolonisation erfolgen.

Abbildung 10 stellt das Ziel dieser Arbeit graphisch dar. Hierfür sollten mittels des SELEX-Prozesses aus einer DNA-Bibliothek für das rekombinant humane E-Selektin spezifische DNA-Aptamere selektiert werden. Die Ermittlung der Aptamer-Selektin-Bindungsaffinität sollte durch Filter-Retentions-Assays erfolgen. Mittels Durchflusszytometrie sollten die selektierten Aptamere bezüglich ihres inhibitorischen Charakters untersucht werden. Schließlich sollten dynamische Untersuchungen zur Ermittlung der Beständigkeit der Aptamer-Selektin-Bindung unter physiologischen Scher-Bedingungen durchgeführt werden. Die statischen durchflusszytometrischen Experimente und die dynamischen Untersuchungen sollten mit Hilfe von geeigneten malignen Zellen, die eine Überproduktion von Selektin-Liganden aufweisen, erfolgen.

2 MATERIAL

2.1 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), peQlab (Erlangen) und Sigma-Aldrich (München) in Analyse-Qualität käuflich erworben. Vollentsalztes Wasser (dH₂O) wurde durch die PURLAB Plus Wasseraufbereitungsanlage gewonnen. Sofern nicht gesondert aufgelistet, wurden alle Verbrauchsmaterialien von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2 LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen zur Aptamerselektion.

Name	Zusammensetzung
2 x B&W-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl
Elutionspuffer A	3 M Natriumacetat
Elutionspuffer B	0.3 M Natriumacetat
Kopplungspuffer A	1 x PBS; pH 7.4, 1 µg BSA/µL
Kopplungspuffer B	1 x PBS; pH 7.4, 1 µg BSA/µL, 3 mM MgCl ₂
Kopplungspuffer C	1.25 x PBS; pH 7.4, 1 µg BSA/µL
10 x PBS	1.37 M NaCl, 27 mM KCl; pH 7.4
Selektionspuffer	1 x PBS; pH 7.4, 3 mM MgCl ₂
Tris-HCl	1 M Tris-HCl; pH 7.4
Biotin-Lösung	1 x PBS, 0.9 mM Biotin

Tabelle 7: Verwendete Puffer zur Nucleinsäure-Analyse.

Name	Zusammensetzung
APS	10% (w/v) APS in dH ₂ O
6 x DNA Ladepuffer	10 mM Tris-HCl; pH 7.6, 60% (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA, 0.03% (w/v) Bromphenolblau, 0.03% (w/v) Xylencyanol FF
10 x PCR Puffer B	0.8 M Tris-HCl; pH 8.8, 0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.2% (w/v) Tween-20
10 x PNK Puffer A	0.5 M Tris-HCl; pH 7.6, 0.1 M MgCl ₂ , 0.05 M DTT, 1 mM Spermidin
2 x RNA Ladepuffer	95% (v/v) Formamid, 0.025% (w/v) Bromphenolblau, 0.025% (w/v) Xylencyanol FF, 0.025% (w/v) SDS, 0.5 mM EDTA
50 x TAE	2 M Tris-HCl, 50 mM EDTA, 57% (v/v) Essigsäure
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	0.4 M Tris-HCl; pH 7.8, 0.1 M MgCl ₂ ; 0.1 M DTT; 5 mM ATP

Tabelle 8: Verwendete Kulturmedien und Zusätze.

Name	Hersteller
DMEM	PAA, Cölbe
RPMI-1640	PAA, Cölbe
FKS	PAA, Cölbe
Pen/Strep	PAA, Cölbe
SOC-Medium	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA (1 x) 0.05% / 0.02% in DPBS	PAA, Cölbe
Endothelial Cell Growth Medium MV	PromoCell, Heidelberg
SupplementMix	PromoCell, Heidelberg
DetachKit	PromoCell, Heidelberg
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg

Tabelle 9: Verwendete Puffer zur Protein-Analyse.

Name	Zusammensetzung
10 x BCIP-Lösung	0.5% (w/v) BCIP in DMF
10 x NBT-Lösung	0.1% (w/v) NBT in Dot Blot Reaktionspuffer
Sensitive Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	5% (w/v) AlSO ₄ , 0.02% (w/v) CBB-G250, 10% (v/v) Ethanol, 2% (v/v) H ₃ PO ₄ (100%)
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung	45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Name	Zusammensetzung
Dot-Blot AK-Puffer	2.5% (w/v) Magermilchpulver in 1 x PBS
Dot-Blot AP-Substratlösung	1 x NBT, 1 x BCIP in Dot Blot Reaktionspuffer
Dot-Blot Blockpuffer	5% (w/v) Magermilch in 1 x PBS
Dot-Blot Reaktionspuffer	0.1 M Tris; pH 9.5, 4 mM MgCl ₂
4 x Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl; pH 8.8, 0.4% (w/v) SDS
4 x Sammelgelpuffer	0.5 M Tris-HCl; pH 6.8, 0.4% (w/v) SDS
5 x SDS-Laufpuffer	0.125 M Tris; pH 8.3, 0.96 M Glycin, 0.5% (w/v) SDS
2 x SDS-Ladepuffer	0.125 M Tris-HCl; pH 6.8, 4% SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0.002% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 10: Verwendete Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten.

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton pro 1 Liter dH ₂ O
LB-Agar	2.5% (w/v) LB-Medium, 1.5% (w/v) Agar
Ampicillin Stocklösung	100 mg Ampicillin pro mL dH ₂ O

2.3 MATERIALIEN

Tabelle 11: Materialien für die Aptamerselektion.

Name	Hersteller
Dynabeads [®] M-280 Streptavidin	Life Technologies, USA
BcMag [™] Streptavidin Magnetic Beads	Bioclone Inc, USA
Magna-Sep [™] Magnetic Particle Separator	Life Technologies, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin (Biotinylierungsreagenz)	Thermo Scientific, USA
Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10K	Thermo Scientific, USA

Tabelle 12: Filter und Membran für den Filter-Retentions-Assay.

Name	Hersteller
Whatman Protran-Nitrocellulose-Membran, 0.45 µm	Sigma-Aldrich, München
Rotilabo [®] -Blottingpapiere, Dicke 0.35 mm	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 13: Materialien für den *Flow-Assay*.

Name	Hersteller
IBIDI microslides VI	IBIDI, Martinsried
IBIDI microslides VI Schlauch	IBIDI, Martinsried

Tabelle 14: Kommerziell erhältliche Kits.

Name	Hersteller
HiYield [®] Plasmid Mini Kit	Süd-Laborbedarf, Gauting
HiYield [®] PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Süd-Laborbedarf, Gauting

2.4 PROTEINE UND STANDARDS

Tabelle 15: Protein- und DNA-Standards.

Name	Hersteller
O'GeneRuler [™] Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
PageRuler [™] Unstained Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, USA

Tabelle 16: Enzyme.

Name	Hersteller
FIREPol [®] DNA-Polymerase	Solis BioDyne, Estland
T4-Polynucleotidkinase (T4-PNK)	Thermo Scientific, USA
XcmI	Thermo Scientific, USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, USA
ExtrAvidin [®] -Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 17: Proteine und Antikörper.

Name	Hersteller
Rekombinante humane E-Selektin/IgG-Fc-Chimäre	R&D Systems, USA
Rekombinante humane P-Selektin/IgG-Fc-Chimäre	R&D Systems, USA
Rekombinante humane IgG-Fc	R&D Systems, USA
Thrombin	CellSystems, Troisdorf
Streptavidin	New England BioLabs, UK
CA19-9 (mouse monoclonal [121SLE] to CA19-9)	Abcam, UK
Goat anti-human IgG-PE200	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg

Name	Hersteller
Rekombinant human TNF- α	PeproTech, Hamburg

2.5 NUCLEOTIDE EINSCHLIEßLICH OLIGONUCLEOTIDE

Die genutzte DNA-Bibliothek wurde von der Firma Metabion (München), alle anderen kommerziell erworbenen Oligonucleotide von der Firma Life Technologies (Darmstadt) in HPLC-gereinigter Form bezogen.

Tabelle 18: Verwendete Nucleotide und Radionucleotide.

Name	Hersteller
Deoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs)	Carl Roth, Karlsruhe
γ -[32 P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig

Tabelle 19: Kommerziell erworbene Oligonucleotide. Die Bezeichnung E-Sel-R17-Kx ist auf die E-Selektin Selektion der Runde 17, Klon-x zurückzuführen.

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
DNA Pool D_50N	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-N50-CATGCTTATTCTTGTCTCCC
D1-Primer-Fw	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
D1-Primer-Rev-Bio	GGGAGACAAGAATAAGCATG, 5'-Biotin-Modifikation
D1-Primer-Rev	GGGAGACAAGAATAAGCATG
M13-Primer-Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-Primer-Rev	CAGGAAACAGCTATGACC
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG
E-Sel-R17-K13/K3	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTTTTCTAAGTTTAATTATAGCGTTTT AGTTATTGTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K29	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACC GCGAATTCGTGTCACTAAACACCGA TAGTTTCGATTGTCTTTGGTTCATCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K44	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTGTACTAATATAGTAATCATCGTTAA TTAACATTACATATAAGAAGTATACATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K48	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTGTGACGGCGGTTATGCGCGTCACCA CGCACACTCTACTGATGTCGGGCTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K55/90	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACC GTTGTCGTGTGTAAGTTGTGCTTG TTTATTTGGAGCTCACACGATGTCCATGCTTATTCTTGTCTCCC

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
E-Sel-R17-K59/K57	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCGGGTGGGCTTGTCTAGCTGGGTGCA TATGGAGGTGAGTGTTCGTAGTGCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K63	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTAGAGTGTGTATATGAATTTAAAACAC TATTGGCCATACCAATAATGTACATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K65/K50	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTAATACTATAAGCGTATACTATTATA ATACTAATCTTATTTGGTGTAGGTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K70	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTCTGATGTTATGATTGTTATGTGCAT GCTTATTCTTGTCTCCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K78	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTCGCACGGAGAGGTGCGAAAGTGTAT GCACTAGTGGGGGAATGGCGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K79	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGGTGATAATTTTAATTTAAGTACTTC GTTAGTATGAGGGCTTTAGTCCGGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K81	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGCTTGCATGCCTGCAGCCACTCATTT TAAGTAGTGGGGAGGGCGTCTCGGGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K84	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACAGGGGCTATGAGGGAAGTCTAGTGCG CGAAATAATACCGGGCGAGTGTTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K86	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGATTTGGATTTGGGGTGGAGGGTATG GTTTGTGCTGGCGTTCTCATTTCCCATGCTTATTCTTGTCTCCC

Tabelle 20: Selbstpräparierte Oligonucleotide.

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
E-Sel-R17-K8	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACACTACCTAAAGGAGGTGTGGCCCTAT GGGTCGTTCGTATCGAGCACGTCGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K17	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACAGGTTAGGGGTTATGCCCGGAGATC GATCTCTGAACCGGGTTCCTGACTGGCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K51	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACATATATTGAATAATATTGTTTAGGAT TAGGAATTATATAGTCTCCTTTGTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K52	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCGAGTGGCACTGGTGTGGGAATTTGT GGACGTTCCGTCTAACCGGCGGTTTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K58	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTTGGACTTCTAGGGGACCTCCGCCAT GGAATCTAATGGAGGACTACCGGCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K66	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTATATTGATAACTTTAGTTATTAGAG TAAGTTGCTGTACTTGTATACTCCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K69	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTATTATATCGAAATAGTCATTAATAT AGTTATCCGTAGTAATGTGTTGTTTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K71	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGCTTAATTATTATACTTTATAATGTA ATTCATAAGTAGTATGCCTATGACATGCTTATTCTTGTCTCCC

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)
E-Sel-R17-K73	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGCTCAGCGTGGTATTCATGTAGAGAG TTCGACCGTTGACGCGCTATTATGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K75	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTAATAAGTTTCTATTTGTAGTACA TGGGCTAGCTATATATTCTTACTTCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K77	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGTAGTTTAAGATGTACATAAATAGAT TACATATCATCTATCCATATAAACCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K80	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACTGTGTCGCTAGTTGGAAAAGCAAGTGC GGCCTCGACGGTCAGTGTGTTCTGCATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K-b	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCGTTCCTGGGAAGTTAGCCTTGAGGA CCCGAAACGTTACGCATTTCCCGCATGCTTATTCTTGTCTCCC

2.6 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN

E. coli TOP10 (Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) und pUC19-T (pCR[®]2.1-TOPO[®]) wurden von der Firma Life Technologies (USA) käuflich erworben.*

2.7 ZELLINIEN

Die humane Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zelllinie HT29, die humane eosinophile Zelllinie EOL-1- sowie humane *pulmonary microvascular endothelial* Zellen (HPMECs) wurden freundlicherweise von Prof. Schumacher (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zu Verfügung gestellt.

3 METHODEN

3.1 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.1.1 MODIFIZIERUNG VON PROTEINEN

3.1.1.1 PROTEIN-BIOTINYLIERUNG

Für die Immobilisierung von rekombinantem humanen E-Selektin/IgG-Fc-Chimären (rhE-Selektin) an Streptavidin-beschichteten magnetischen Dynabeads[®] wurde die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin genutzt. Hierfür wurde zunächst das Protein rhE-Selektin biotinyliert. Der Einsatz der Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz erlaubte dabei die Übertragung von Biotin auf primäre Amine. Dabei wird *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester aktiviertes Biotin, mit einem langen C-C Spacer (LC-long chain) zur Unterbindung sterischer Hindernisse, in einer Umesterungsreaktion in neutralem bis basischen Milieu (pH 7 - 9) auf das primäre Amin übertragen (Abbildung 11).

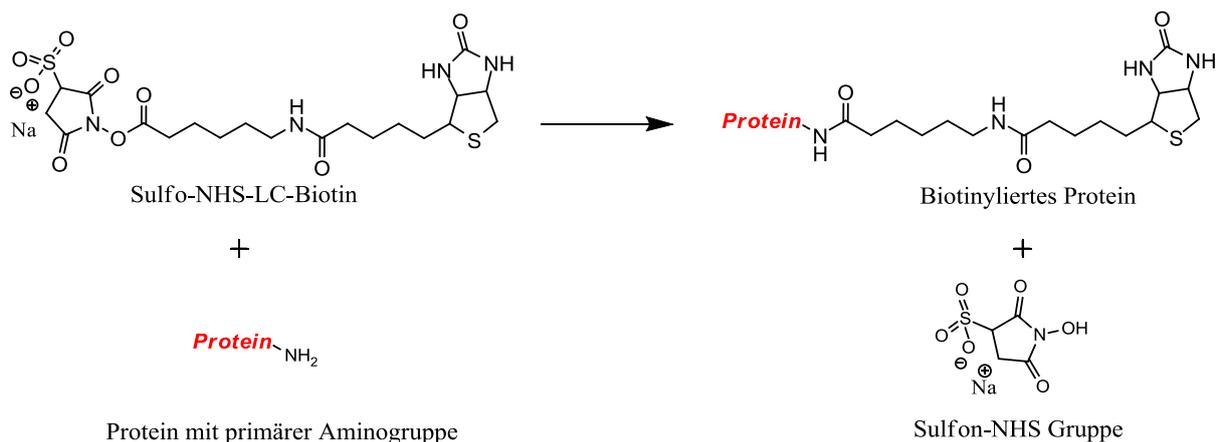


Abbildung 11: Biotinylierungsreaktion. Die primären Aminogruppen eines Peptids oder Proteins können mittels Sulfo-NHS-LC-Biotin durch Bildung eines Amids und der Abspaltung der Sulfo-NHS-Gruppe biotinyliert werden.

Für die Biotinylierung wurde eine 10 mM wässrige Lösung des Biotinylierungsreagenz (M = 556.59 g/mol) frisch angesetzt, in einem dreifachen molaren Überschuss mit 50 µg rhE-Selektin (0.58 nmol; M = 86000 g/mol) versetzt und für 15 Minuten auf Eis und anschließend

für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überschuss an Biotinylierungsreagenz wurde heraus dialysiert. Dazu wurden die biotinylierten rhE-Selektin/IgG-Fc-Chimäre in einer Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10K bei 4 °C gegen 1 x PBS dialysiert. Der Erfolg der Dialyse wurde mittels Dot-Blot (3.1.2.2) nachgewiesen. Um das Protein auf eine eventuelle Degradation zu überprüfen, wurde anschließend ein SDS-PAGE durchgeführt (3.1.2.3).

3.1.1.2 BIOTIN-IMMOBILISIERUNG AUF DYNABEADS[®] (PRÄ-SELEKTIONSBEADS)

Für den Prä-Selektionsprozess wurden die Dynabeads[®] M-280 mit Biotin beschichtet. Hierzu wurden 5 mg Beads mit 50 µL 0.9 mM Biotin-Lösung versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur invertiert. Abschließend wurden die Biotin/Streptavidin beschichteten Dynabeads[®] fünfmal mit Kopplungspuffer C gewaschen und in 1.5 mL desselben Puffers resuspendiert.

3.1.1.3 PROTEIN-IMMOBILISIERUNG AUF DYNABEADS[®] (TARGET-BEADS)

Für den SELEX-Prozess wurden die biotinylierten rhE-Selektin/IgG-Fc-Chimäre auf der Oberfläche von Streptavidin-beschichteten Dynabeads[®] M-280 immobilisiert. Hierzu wurden 5 mg der paramagnetischen Polystyrenkügelchen (10 mg/mL), die auf deren hydrophoben Oberflächen kovalent verknüpfte Streptavidine aufwiesen, fünfmal mit je 500 µL Kopplungspuffer A gewaschen und in 1 mL desselben Puffers resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µg biotinylierter rhE-Selektin/IgG-Fc-Chimäre und durch das leichte Invertieren des Gemisches für 30 Minuten bei 4 °C fand die Immobilisierung des Proteins auf den Beads auf Grund der Biotin/Streptavidin-Interaktion statt. Anschließend wurden die Protein-beschichteten Beads fünfmal mit je 500 µL Kopplungspuffer B gewaschen, in 1.5 mL desselben Puffers resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt. Während des gesamten Prozesses wurde darauf geachtet, dass die Beads weder austrockneten noch aufschäumten.

3.1.2 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

3.1.2.1 DIALYSE

Die biotinylierten rhE-Selektin/IgG-Fc-Chimären wurden in einer Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10K über Nacht bei 4 °C gegen 1 x PBS dialysiert.

3.1.2.2 DOT-BLOT

Zur Überprüfung der Biotinylierungsreaktion wurden 0.4 µg des Proteins vor und nach der Dialyse sowie die äquivalente Menge des unmodifizierten Proteins nebeneinander auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Nach Trocknung der Proben wurde die Membran mit 10 mL Dot-Blot Blockpuffer für 30 Minuten unter leichtem Schütteln zur Blockierung der freien Bindungsstellen inkubiert und anschließend mit 10 mL 1 x PBS gewaschen. In einer Lösung aus 10 mL Dot-Blot AK-Puffer und 1 µL ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase wurde die Membran für eine Stunde erneut unter leichtem Schütteln inkubiert und dreimal für je 5 Minuten mit 15 mL 1 x PBS gewaschen. Als Nachweis der Reaktion wurde die Membran durch Zugabe von 12.5 mL Dot-Blot AP-Substratlösung angefärbt, mit dH₂O gewaschen und nach Trocknung eingescannt.

3.1.2.3 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die analytische Separation und Identifizierung von Proteinen erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli.⁸³ Demnach werden alle Proteine durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) stark negativ geladen und können in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch voneinander getrennt werden. 50 ng Protein wurde hierfür zunächst mit 2x SDS-Proteinladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung in die Geltaschen wurde diese bei 180 V für 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die hierbei verwendeten diskontinuierlich aufgebauten Gele bestehen aus einem fokussierenden Sammel- und einem separierenden Trenngel (Tabelle 21 und Tabelle 22).

Tabelle 21: Zusammensetzung eines Sammelgels für die SDS-PAGE.

Komponente	4%iges PAA-Gel
Sammelgelpuffer (4x)	1x
Acrylamid : Bisacrylamid 37.5 : 1	4%
TEMED (v/v)	0.07%
APS (w/v)	0.07%

Tabelle 22: Zusammensetzung eines Trenngels für die SDS-PAGE.

Komponente	7.5%iges PAA-Gel	15%iges PAA-Gel
Trenngelpuffer (4x)	1x	1x
Acrylamid : Bisacrylamid 37.5 : 1	7.5%	15%
TEMED (v/v)	0.07%	0.07%
APS (w/v)	0.07%	0.07%

Die auf dem SDS-PAA-Gel separierten Proteine wurden durch Inkubation in Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung (60 - 240 Minuten) sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel durch Schwenken in Entfärberlösung entfärbt und eingescannt.

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 PRÄPARATION VON NUCLEINSÄUREN

3.2.1.1 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Strängen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wird zunächst der DNA-Strang durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und anschließend die Primer bei einer von der Primer-Länge und -Sequenz abhängigen Temperatur (Annealing-Temperatur) für 30 Minuten hybridisiert. Bei dem sich anschließenden Elongations-Schritt findet die exponentielle Amplifikation der DNA-Stränge durch den Einbau komplementärer dNTPs mit Hilfe der DNA-Polymerase bei 72 °C in Anwesenheit von Magnesium-Ionen statt. Diese drei Teilschritte des PCR (Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation) werden abhängig von der Menge an vorgelegtem DNA-Template wiederholt. Für die PCR wurden die in der Tabelle 23 angegebenen Komponenten eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde eine modifizierte Form des *Thermus aquaticus* (FIREPol® DNA-Polymerase) eingesetzt.

Tabelle 23: PCR-Mastermix.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x PCR FIREPol-Puffer B	10 µL	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl	1.5 mM
D1-Primer-Rev-Bio (100 µM) bzw. D1-Primer-Rev (100 µM)	1 µl	1.0 µM
D1-Primer-Fw (100 µM)	1 µL	1.0 µM
dNTPs (25 mM)	1 µL	250 µM
FIREPol® (5 U/µL)	1 µL	0.05 U/µL
DNA-Template	1 - 50 µL	
dH ₂ O	ad 100 µL	

Das in Tabelle 24 angegebene Temperaturprogramm wurde für den SELEX-Prozess verwendet. Da eine Verlängerung der Inkubationszeiten zu einem saubereren PCR-Produkt führte, wurden alle folgenden Reaktionen mit 60s Inkubationszeit durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels 10%igem nativen PAA-Gel (3.2.3.1) analysiert.

Tabelle 24: PCR-Programm für die SELEX.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	30 bzw. 60 Sekunden	5 - 20
Primerhybridisierung	60 °C	30 bzw. 60 Sekunden	
Elongation	72 °C	30 bzw. 60 Sekunden	
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	
	4 °C	∞	

3.2.1.2 KOLONIE-PCR

Um nach der Transformation (3.4.4) die von *Escherichia coli* (*E. coli*) aufgenommenen rekombinanten Plasmide nachzuweisen, wurden die Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher aus den entsprechenden Agarplatten gepickt, und der durch die Primer markierte DNA-Bereich innerhalb der Plasmid-DNA mittels Kolonie-PCR analog zu dem in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben amplifiziert. Für die Kolonie-PCR wurden ein Viertel die in der Tabelle 23 angegebenen Komponenten eingesetzt und anstelle des DNA-Templates der Zahnstocher

in der Lösung eingetaucht. Abschließend wurde das Kolonie-PCR-Produkt mittels 10%igem nativen PAA-Gel (3.2.3.1) analysiert.

3.2.2 MODIFIKATION VON NUCLEINSÄUREN

3.2.2.1 DNA-STRANGTRENNUNG

Zur Selektion von DNA-Aptameren wird einzelsträngige DNA benötigt, was eine Trennung der aus der PCR (3.2.1.1) entstandenen DNA-Doppelstränge nötig machte. Hierfür wurden die doppelsträngigen DNAs, die durch den Biotin-modifizierte Rev-Primer mit Streptavidin interagieren können, auf Streptavidin-beschichtete BcMagTM Magnetic Beads immobilisiert. Dazu wurden 100 µL Beads zweimal mit je 100 µL 1 x B&W Puffer gewaschen, in dem die Beads mit Hilfe eines Magnetständers aus der Lösung separiert und erneut im Puffer aufgenommen wurden. Die gewaschenen und in 100 µL desselben Puffers aufgenommenen Beads wurden mit einem Gemisch aus 50 µL gereinigtem PCR-Produkt und 50 µL 2 x B&W Puffer versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Lösung auf Grund der Sedimentation der Beads immer wieder auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die mit dsDNA beladenen Beads zweimal mit je 100 µL 1 x B&W Puffer gewaschen, in 20 µL 150 mM NaOH aufgenommen und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Abnahme des Überstandes mittels magnetischer Separation wurde die durch die alkalische Denaturierung entstandene ssDNA, die sich zum einen Teil in der Lösung und zum anderen Teil an den Beads befanden, voneinander getrennt. Der Überstand wurde mit ca. 30 µL 100 mM HCl neutralisiert und dessen Konzentration am Nano-Drop (3.2.3.6) bestimmt.

3.2.2.2 5'-RADIOAKTIVMARKIERUNG VON SSDNA

Um ssDNA in geringen Mengen detektieren zu können, wird die Sensitivität von radioaktiven Isotopen ausgenutzt und die Oligonucleotide deshalb durch ³²P-Modifikation markiert. Hierbei wird durch die T4-Polynucleotidkinase die γ-[³²P]-Phosphatgruppe des ATPs auf die 5'-Hydroxylgruppe des Oligonucleotides übertragen (Abbildung 12).

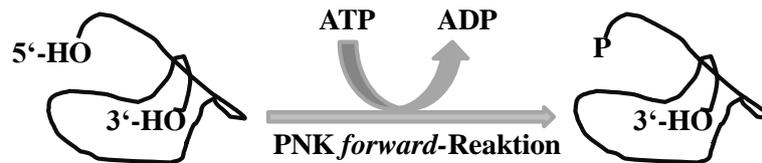


Abbildung 12: Darstellung der PNK-forward-Reaktion. Die γ - $[^{32}\text{P}]$ -Phosphatgruppe des ATPs wird enzymatisch auf das 5'-OH von einzelsträngigen Nucleinsäuren übertragen. Dabei wird ATP zu ADP dephosphoryliert.

Synthetisch hergestellte DNA bzw. Primer besitzen statt der 5'-Phosphatgruppe einen Hydroxylgruppe und brauchen im Gegensatz zu *in vivo* hergestellter DNA nicht vor der Radioaktivmarkierung dephosphoryliert werden. Die Markierungsreaktion fand bei 37 °C für 30 Minuten gefolgt von einer Enzymdeaktivierung bei 80 °C für 10 Minuten statt. Das Produkt wurde mittels 10%igem denaturierendes PAA-Gel gereinigt (3.2.3.3) und anschließend elektrophoretisch auf Reinheit geprüft. Der Reaktionsansatz für die 5'-Radioaktivmarkierung ist in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die 5'-Radioaktivmarkierung von ssDNA.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
ssDNA		1.0 μM
10 x PNK Puffer A	1.0 μL	1 x
γ - $[^{32}\text{P}]$ -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)	2.0 μL	2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$
T4-PNK (10 U/ μL)	1.0 μL	1 U/ μL
dH ₂ O	ad 10 μL	

3.2.3 NUCLEINSÄUREANALYTISCHE METHODEN

3.2.3.1 NATIVE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Doppelsträngige Nucleinsäuren können mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und analysiert werden. Dazu wurde die DNA Probe mit 6 x DNA Ladepuffer auf ein Volumen von 6 μL aufgefüllt und auf ein 10%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 200-330 V in 1 x TAE statt. Tabelle 26 gibt die Zusammensetzung eines 10%igen PAA-Gels an. Durch abschließende Zugabe von APS wurde die Polymerisation des Gels initiiert.

Tabelle 26: Zusammensetzung eines 10%igen nativen PAA-Gels.

Komponente	10%iges Gel
TAE	1x
Acrylamid : Bisacrylamid 19 : 1 (w/v)	10%
TEMED (v/v)	0.1%
APS (w/v)	0.1%

3.2.3.2 DENATURIERENDE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Einzelsträngige Nucleinsäure kann mittels denaturierender Polyacrylamidgele getrennt und analysiert werden. Dazu wird den Komponenten eines nativen Gels (Tabelle 26) 8 M Harnstoff als denaturierendes Agens zugesetzt. Die Elektrophorese fand unter den in 3.2.3.1 angegebenen Bedingungen statt.

3.2.3.3 REINIGUNG VON NUCLEINSÄUREN

Um überschüssige Primer nach der PCR aus dem Produkt zu entfernen, wurde unter anderem eine Reinigung mittels PCR Clean-up/Gel Extraction Kit durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Des Weiterem wurden die PCR-Produkte mittels PAGE gereinigt. Hierbei wurde das Produkt auf mindestens zwei Bahnen eines 10%igen nativen PAA-Gels oder eines 1%igen Agarose-Gels aufgetragen, zusammen mit einem Größenstandard elektrophoretisch getrennt, und ein Teil des Gels mittels Ethidiumbromid-Färbung analysiert. Die gewünschte Produkt-Bande wurde anschließend aus dem nicht Ethidiumbromid-gefärbten PAA-Gel auf gleicher Höhe ausgeschnitten. Durch Diffusionselution (3.2.3.4) gefolgt von einer Isopropanolpräzipitation (3.2.3.5) wurden die Nucleinsäuren abschließend aus dem Gel extrahiert und aufkonzentriert. Die Nucleinsäuren aus einem Agarose-Gel wurden mittels PCR Clean-up/Gel Extraction Kit aus dem Gel zurückgewonnen. Die Reinigung der einzelsträngigen DNA erfolgte analog zu Reinigung der PCR-Produkte, wobei hierfür 10%ige denaturierende Gele verwendet wurden.

3.2.3.4 DIFFUSIONSELUTION VON NUCLEINSÄUREN

Bei der Elution von Nucleinsäuren aus PAA-Gelen wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 0.3 M Natriumacetatlösung (pH 5.4) überschichtet und bei 45 - 55 °C und 1200 rpm in einem Thermomixer für 120 Minuten inkubiert. Hierbei diffundieren die negativ geladenen Nucleinsäuren aus dem PAA-Gel hinaus und können anschließend mittels Isopropanol präzipitiert werden (3.2.3.5).

3.2.3.5 ISOPROPANOLPRÄZIPITATION

Die Präzipitation von Nucleinsäuren erfolgt auf Grundlage der geringen Löslichkeit von polaren Molekülen in unpolaren Lösungen. Die nucleinsäurehaltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.4) und einfachem Volumen an eisgekühltem Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei -20 °C für 30 Minuten oder über Nacht präzipitiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Um Salze zu entfernen, wurde das Pellet mit 100 µL 70%igem eisgekühltem Ethanol für 5 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, bei 50 °C getrocknet und in dH₂O aufgenommen.

3.2.3.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUCLEINSÄUREN

Die Konzentration von Nucleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Dabei gilt Gleichung 1:

$$\text{Gleichung 1:} \quad \text{Konzentration} = \frac{A_{260} * V * U [\mu\text{g}]}{1000 [\mu\text{L}]}$$

A₂₆₀: Absorption bei 260 nm

V: Verdünnungsfaktor

U: Umrechnungsfaktor (doppelsträngige DNA: 5, einzelsträngige DNA: 40)

Die in dH₂O aufgenommenen Nucleinsäuren wurde an einem *NanoDrop-ND1000* (PeqLab) photometrisch vermessen und die molare Konzentration unter der Annahme eines durchschnittlichen Molekulargewichts von 327 g/mol pro Nucleotid berechnet. Der

Reinheitsgrad der Nucleinsäuren wird dabei aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Einem Wert zwischen 1.8 und 2.0 entspricht eine hohe Reinheit.

3.2.3.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Größere DNA Moleküle können mittels eines Agarose-Gels getrennt und nachgewiesen werden. Um das in dieser Arbeit verwendete Plasmid zu reinigen, wurde ein 1%iges Agarose-Gel verwendet. Dafür wurde 1% Agarose in 1 x TAE in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und in eine Agarose-Gel-Kammer gegossen. Nach ca. 30 Minuten wurde die mit 6 x DNA Ladepuffer versetzte DNA in die Geltaschen des auspolymerisierten Gels pipettiert und die Elektrophorese bei 160 V durchgeführt.

3.2.4 NACHWEIS VON NUCLEINSÄUREN

3.2.4.1 ETHIDUMBROMID-FÄRBUNG

Zur Detektion von Nucleinsäuren dient der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr). Dazu wurde das analytische Gel für einigen Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (4 µg EtBr pro mL 1 x TAE) getaucht und die Nucleinsäuren als fluoreszierenden Banden unter UV-Licht bei 312 nm visualisiert.

3.2.4.2 AUTORADIOGRAPHIE

Eine weitere Methode zur Visualisierung von Nucleinsäuren stellt die Autoradiographie dar, wobei das Aussenden von Betastrahlen durch radioaktive Isotope detektiert werden kann. Die auf einem analytischen PAA-Gel aufgetragenen ³²P-radioaktiv markierten einzelsträngigen Nucleinsäuren (3.2.2.2) wurden zu Detektion in einer Phosphorimager-Kassette platziert, mit einer Phosphoimager-Screen bedeckt und in Abhängigkeit von der zu detektierenden Konzentration für einige Minuten bis Stunden exponiert. Die dabei auf dem Screen hinterlassene Schwärzung wurde mittels eines Phosphorimagers der Firma BioRad detektiert und mit der Software Quantity One[®] quantifiziert.

3.3 *IN VITRO* SELEKTION VON DNA-APTAMEREN (SELEX)

Die *in vitro* Selektion von DNA-Aptameren mit spezifischer Affinität für humanes E-Selektin wurde mit 500 pmol des einzelsträngigen Nucleinsäurepools DNA Pool D_50N gestartet. Zur Separation von DNA Molekülen mit Affinität für Biotin, Streptavidin, bzw. zu den magnetischen Dynabeads wurde vor Beginn der jeweiligen Selektionsrunde zunächst eine Prä-Selektion durchgeführt.

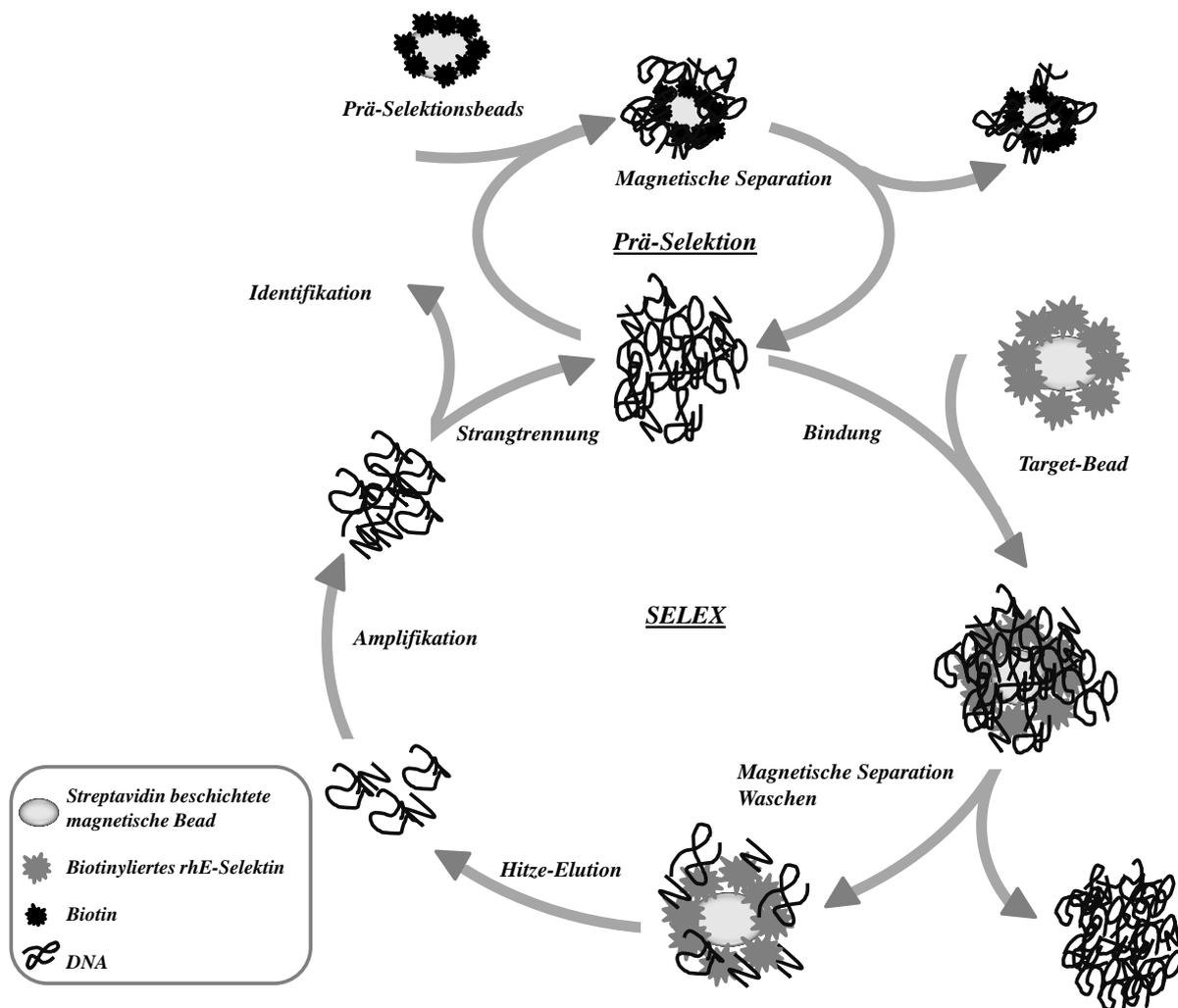


Abbildung 13: Darstellung der *in vitro* Prä-Selektion und Selektion von Aptameren. Nucleinsäuren werden basierend auf ihren Affinitäten von einander getrennt. Einzelsträngige Nucleinsäuren werden mit Prä-Selektionsbeads inkubiert. Die nicht an den Beads gebundenen Nucleinsäuren werden mittels magnetischer Separation aus dem Gemisch entfernt und in dem nachfolgenden SELEX-Prozess eingesetzt. Die aus der Prä-Selektion gewonnenen Nucleinsäuren werden nach der Inkubation mit den Target-Beads stringent gewaschen, eluiert, amplifiziert, regeneriert und erneut nach der Prä-Selektion in der SELEX eingesetzt.

Dazu wurden die Nucleinsäuren mit 30 nmol Biotin-Streptavidin-Dynabeads (Prä-Selektionsbeads) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung alle 10 Minuten auf- und abpipettiert wurde, um eine Sedimentation der Beads zu verhindern. Die

an den Prä-Selektionsbeads gebundenen Nucleinsäuren wurden durch magnetische Separation aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde mit 50 pmol auf magnetische Beads immobilisiertem rhE-Selektin (Target-Beads) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier wurde die Sedimentation der Beads durch auf- und abpipettieren verhindert. Nicht gebundene und somit nicht affine Nucleinsäuren wurden über magnetische Separation entfernt, die Target-Beads mit 200 µL Selektionspuffer gewaschen und in 55 µL dH₂O aufgenommen. Durch Hitze-Elution bei 80 °C für 3 Minuten wurden die rhE-Selektin-Aptamere vom Protein gelöst und durch magnetische Separation abgetrennt. Die in 50 µL Eluat gelösten Nucleinsäuren wurden mittels PCR (3.2.1.1) amplifiziert und das PCR-Produkt durch nativer PAGE (3.2.3.1) überprüft. Einzelstränge für die nächste Selektionsrunde wurden durch DNA-Strangtrennung (3.2.2.1) gewonnen. Jeder neuen Selektionsrunde ging erneut eine Prä-Selektion voraus. Zur Steigerung der Stringenz wurden die Waschschritte proportional gesteigert. Abbildung 13 stellt die schematische Darstellung der *in vitro* Selektion von Aptameren da.

3.4 KLONIERUNGSTECHNIKEN

Zur Separation der angereicherten Nucleinsäuren wurde die Selektionsrunde 17 mittels TA-Klonierung in den Vektor pUC19-T ligiert und kloniert.

3.4.1 RESTRIKTION VON NUCLEINSÄUREN

Um das ringförmige doppelsträngige Plasmid für die TA-Klonierung zugänglich zu machen, wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym XcmI geschnitten. Dabei schneidet das Enzym zwischen 5'-CCA und 3'-GGT, wenn 9 Nucleotide zwischen den beiden Erkennungssequenzen vorhanden sind (Abbildung 14).

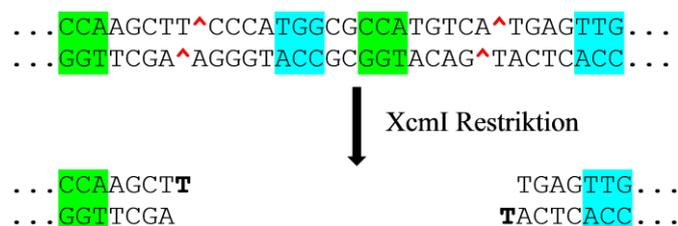


Abbildung 14: pUC19-T Restriktionsschnittstellen für XcmI. Die Restriktionsendonuclease XcmI schneidet zwischen 5'-CCA und 3'-GGT bei Vorhandensein von 9 Nucleotiden zwischen den beiden Erkennungssequenzen. Dabei restriktiert das Enzym zwischen dem fünften und sechsten Nucleotid nach der 5'-CCA Basenabfolge, wodurch 3'-Desoxythymidin-Überhänge entstehen.

Das ringförmige doppelsträngige DNA Plasmid wird somit zu einem linearisierten Vektor mit 3' Desoxythymidin-Überhängen geschnitten.

Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes gibt Tabelle 27 wieder. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei 37 °C und anschließend für 30 Minuten bei 80 °C inkubiert und der Erfolg der Restriktion mittels 1%igem Agarose-Gel (3.2.3.3) und anschließender Ethidiumbromid-färbung (3.2.4.1) überprüft. Das aus dem Gel ausgeschnittene restrigierte Plasmid wurde dann mittels PCR Clean-up/Gel Extraction Kit dem Gel eluiert.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
pUC19-T (0.8 µM)	4 µL	0.2 µM
10x NEB	2 µL	1x
XcmI (5 U/µL)	1 µL	0.25 U/µL
dH ₂ O	ad 20 µL	

3.4.2 LIGATION

Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht mit dem in Tabelle 28 aufgeführten Reaktionsansatz. Dabei wurde mit einem molaren Verhältnis von Vektor und Insert von 1:3 gearbeitet.

Tabelle 28: Ligationsansatz.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Restringierte pUC19-T (0.06 µM)	2 µL	0.012 µM
PCR-Produkt (0.9 µM)	0.4 µL	0.036 µM
T4-DNA-Ligase (5 U/µL)	1 µL	0.5 U/µL
dH ₂ O	ad 10 µL	

3.4.3 HERSTELLUNG VON *E. COLI* ZELLEN ZUR TRANSFORMATION MITTELS ELEKTROPORATION

Um *E. coli* TOP10-Zellen für die Transformation mittels Elektroporation zugänglich zu machen, müssen sie elektrokompente Eigenschaften vorweisen. Dazu wurde eine

Übernachtskultur von *E. coli* TOP10-Zellen in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm angesetzt, am folgenden Tag 400 mL LB-Medium damit angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischer Dichte (OD₆₀₀) von 0.5 weiter kultiviert. Die Kultur wurde dann sofort auf Eis abgekühlt, in ein vorgekühltes 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C für 15 Minuten und 3000 g zentrifugiert. Im Anschluss folgten vier Waschschrte mit 2 x 50 mL und 2 x 25 mL eiskaltem dH₂O. Das Pellet wurde in 2 mL 10%igem Glycerol aufgenommen, die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert.

3.4.4 TRANSFORMATION VON *E. COLI* MITTELS ELEKTROPORATION

Die Transformation des ligierten Vektors erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden 1 µL vorgekühlter Ligationsansatz in 50 µL elektrokompetenter *E. coli* TOP10-Zellsuspension gegeben und in eine ebenfalls vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach der Transformation bei 1.8 kV wurde sofort mit 450 µL vorgewärmten SOC-Medium überschichtet. Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 1 Stunde bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, auf Ampicillin-haltigen LB-Platten (3.4.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zu Kontrolle wurde die Transformation zudem mit dH₂O, mit geschnittenem sowie mit ungeschnittenem Vektor durchgeführt.

3.4.5 KULTIVIERUNG AUF LB-AMPICILLIN-AGAR-PLATTEN

Zur Kultivierung der transformierten *E. coli* TOP10-Zellen wurden LB-Ampicillin-Agar-Platten gegossen. Für das ansetzen der Platten wurde das zuvor autoklavierte und auf 50 °C abgekühlte LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/mL) versetzt und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegeben, auskühlen gelassen und bei 4°C zwischengelagert. Aus dem Transformationsansatz wurden 50 bzw. 100 µL unter sterilen Bedingungen auf den Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank kultiviert.

3.4.6 ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER PLASMID-DNA

Die auf den LB-Ampicillin-Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das mit DNA ligiertem Plasmid kontrolliert und über Nacht in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Präparation des Plasmides erfolgte mit dem HiYield[®] Plasmid Mini

Kit nach Herstellerangaben. Für die Identifizierung der in den Plasmiden ligierten DNA-Stränge wurden die isolierten Plasmide von der Firma GATC unter Verwendung der Sanger-Methode sequenziert. Als Primer wurde PCR1 (Firma GATC) ausgewählt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mithilfe der Software Vector NTI und MegAlign.

3.5 CHARAKTERISIERUNG IDENTIFIZierter APTAMERE

3.5.1 FILTER-RETENTIONS-ASSAY (FRA)

Die Interaktion zwischen selektierten Aptameren und Proteinen kann über einen Filter-Retentions-Assay nachgewiesen werden. Ebenfalls können Dissoziationskonstanten über diese Technik bestimmt werden. Wegen der Undurchlässigkeit der Nitrocellulose-Membran für größere Proteine, können ebenfalls kleine radioaktiv markierte Nukleinsäuren auf der Membran zurückgehalten werden, wenn diese mit dem Protein interagieren.

Hierfür wurde eine konstante Menge an radioaktiv markierter DNA (< 1 nM) mit steigenden Konzentrationen an Protein ($0 - 1$ μ M) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 15 Minuten in 0.4 M KOH-Lösung und für 5 Minuten in dH_2O vorbehandelt, wodurch unspezifische Bindungen auf der Membranoberfläche verhindert werden. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran über zwei in Selektionspuffer äquilibrierte Blottingpapiere gelegt und in eine 96-well-Dot Blot-Apparatur (Manifold I Dot-BlotSystem, Whatman) eingespannt. Unter Vakuum wurde die eingespannte Nitrocellulose-Membran 2 x mit 200 μ L Selektionspuffer gewaschen, die Reaktionsansätze anschließend über die Membran filtriert und die Membran erneut 2 x gewaschen. Auf die ausgespannte und getrocknete Membran wurde eine konstante Menge radioaktiv markierter DNA als 100% Kontrolle pipettiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde zur autoradiographischen Detektion und Auswertung in eine Phosphorimager-Kassete gelegt und mit dem Phosphorimager gescannt (3.2.4.2). In Abbildung 15 ist die FRA schematisch dargestellt.

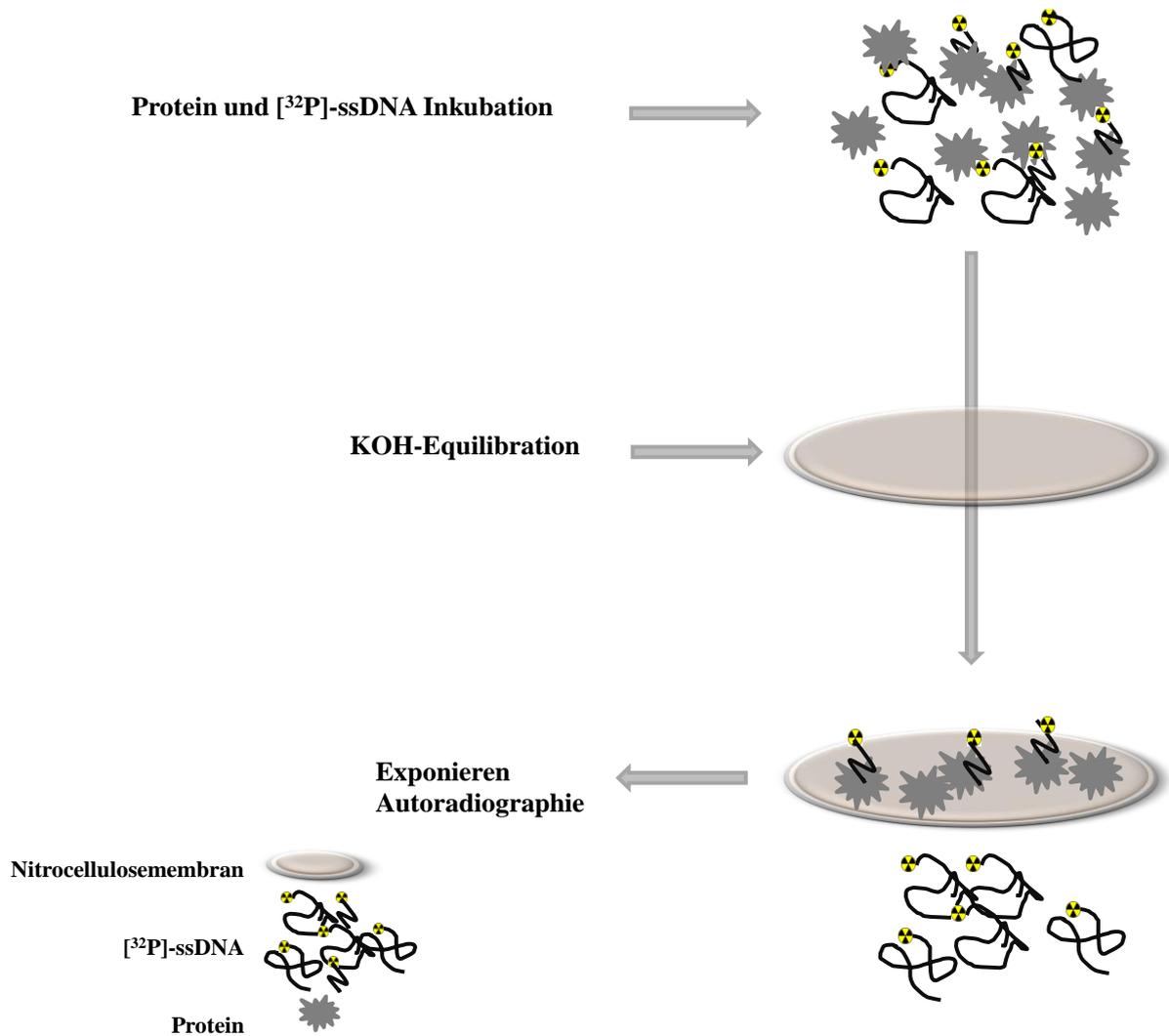


Abbildung 15: Darstellung des Filter-Retentions-Assays. Das vorinkubierte Gemisch aus Protein und ^{32}P -DNA wird über eine in KOH equilibrierte Nitrocellulose-Membran filtriert. Dabei wird die an das Protein gebundene ^{32}P -DNA von der Membran zurückgehalten, während die nicht gebundene ^{32}P -DNA die Membran passieren kann. Die Detektion erfolgt mittels Autoradiographie.

Für die Bestimmung und die graphischen Darstellung der Dissoziationskonstanten (K_d) wurden die erhaltenen Daten mittels der Software GraphPad Prism[®] (La Jolla California, USA) ausgewertet. Dabei wurde für die K_d -Berechnung das *One-Site-Binding-Model* (Gleichung 2) zu Grunde gelegt. Dabei gilt B_{max} als maximal möglicher Anteil gebundener DNA und C_{Protein} als Proteinkonzentration.

$$\text{Gleichung 2: } \text{DNA}_{\text{gebunden}} = \frac{B_{\text{max}} \cdot C_{\text{Protein}}}{K_d + C_{\text{Protein}}}$$

Für die Untersuchung der Bindungsaffinität der Aptamere in Anwesenheit von Kompetitoren (Kontroll-DNA) wurde zunächst die Proteinsverdünnungsreihe mit der doppelten Menge an Kompetitor und anschließend mit dem zu überprüfenden Aptamer inkubiert.

3.5.2 SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE VON APTAMEREN MITTELS *MFOLD*

In Abhängig der Nucleotidabfolge falten sich einzelsträngige Oligonucleotide in bestimmte Sekundärstrukturen, die für die spezifische Bindung der Aptamere an ihr Zielmolekül verantwortlich sind. Die Ermittlung möglicher Aptamer-Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe des Programms *Mfold* (Version 2.3).⁸⁴ Die durch das Programm vorgeschlagenen Strukturen dienten als Grundlage für eine spätere Verkürzung der Aptamere, um deren Bindemotiv identifizieren zu können. Dafür wurden diese bis zu den Loops verkürzt, käuflich erworben und mittels Filter-Retentions-Assay (3.5.1) auf ihre Bindung zum jeweiligen Zielprotein überprüft.

3.5.3 ZIRKULARDICHROISMUS

Die Strukturaufklärung von chiralen Molekülen kann spektroskopisch erfolgen. Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung von optisch aktiven Molekülen mit rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht. Die hierbei entstehenden Unterschiede im Absorptionsverhalten (Extinktionskoeffizienten, Elliptizität) bei einer bestimmten Wellenlänge kann spektroskopisch verfolgt werden. Hierfür wurden die Oligonucleotide in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) oder in 5 μ M Selektionspuffer gelöst, in eine Quartz Küvette überführt und bei 20 °C im Spektralbereich von 200 - 320 nm vermessen (*jasco J-815 CD Spectrometer*).

3.5.4 UV-SPEKTROSKOPIE

In Abhängigkeit der Oligonucleotid-Zusammensetzung unterscheiden sich Oligonucleotide charakteristisch in ihrer Schmelztemperatur (*melting point*; T_m), welche ein Maß für die Stabilität der Oligonucleotide darstellt. Für die UV-spektroskopische Ermittlung der Schmelztemperatur der selektierten Aptamere wurde eine 5 μ M Aptamer-Lösung in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 vorbereitet und in eine Quartz Küvette überführt. Die Messung erfolgte bei 260 nm in einem Temperaturbereich von 25 - 80 °C (Temperaturschritt: 1 °C pro Minute) in einem *Varian Cary Bio 300 UV-Visible Spectrophotometer*. Für die T_m -Berechnung wurde die van't-Hoff-Gleichung zu Grunde gelegt.

3.5.5 NUCLEASE-STABILITÄTS-ASSAY

Zur Ermittlung der Nuclease-Stabilität der Aptamere wurden die radioaktiv markierten Aptamere mit 100 μL vortemperiertem Voll-Medium bei 37 °C inkubiert. In bestimmten Zeitabständen (0 - 720 Minuten) wurden jeweils 10 μL des Inkubationsansatzes entnommen, zu 5 μL 2 x RNA Ladepuffer gegeben und anschließend in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Nach Beenden der Probesammlung wurden die eingefrorenen Ansätze zügig aufgetaut und mittels 10%igem denaturierendem PAA-Gel analysiert.

3.6 UNTERSUCHUNG DER APTAMER-PROTEIN-INTERAKTION

3.6.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Zellen können anhand ihrer physikalischen Eigenschaften, wie der Zellgröße, ihrer relativen Granularität und Fluoreszenzintensität, mittels Durchflusszytometrie auf Grund einer unterschiedlichen Lichtstreuung voneinander unterschieden werden. Während durch das seitwärts gerichtete Streulicht (side scatter; SSC) Informationen über die Zellgranularität erhalten werden kann, gibt das Vorwärtstreulicht (forward scatter; FSC) Informationen über die Zellgröße. Des Weiteren kann durch entsprechende Fluoreszenzkanäle ein an den Zellen gebundener Fluorophor detektiert werden. Hierzu wurden rhE-/P-Selektin/IgG1-Fc-Chimäre mit einem Goat-anti-human IgG-Phycoerythrin Antikörper (IgG-PE) markiert (Abbildung 16 (1)), um die von HT29-Zellen präsentierenden Liganden detektieren zu können. Zur Ermittlung des inhibitorischen Bindungscharakters der selektierten Aptamere wurden 0.2 μM PE-markiertes Selektin mit 1.2 - 30 μM Aptamer zu gleichen Teilen mit DPBS+-Puffer versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 16 (2)). Anschließend wurden 20 μL des Aptamer-Selektin-IgG-PE Komplexes bzw. IgG-PE als Kontrolle mit 1×10^5 Zellen/100 μL DPBS+ für 30 Minuten auf Eis inkubiert (finale Konzentration der Aptamere: 0.2 - 5 μM , Selektin: 16.7 nM, Abbildung 16 (3)), bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert, die Zell-Pellet in 100 μL DPBS+ aufgenommen und durchflusszytometrisch am *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences) untersucht. Um die Spezifität der Inhibition nachzuweisen, wurden mit gleichen Primeren flankierte, unspezifische DNA Moleküle ebenfalls wie oben beschrieben behandelt und untersucht. Als Positivkontrolle diente der Carbohydrat-Antigen-19-9 Antikörper (CA19-9, 0.2 μM). Dabei wurden die Zellen zuerst mit CA19-9 für 30 Minuten auf Eis und anschließend mit PE-markiertem Selektin inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die toten Zellen von den lebenden Zellen durch *gaten* eliminiert,

10.000 Zellen (Events) vermessen und mittels *CellQuest* Software (Version 3.2.1) ausgewertet.

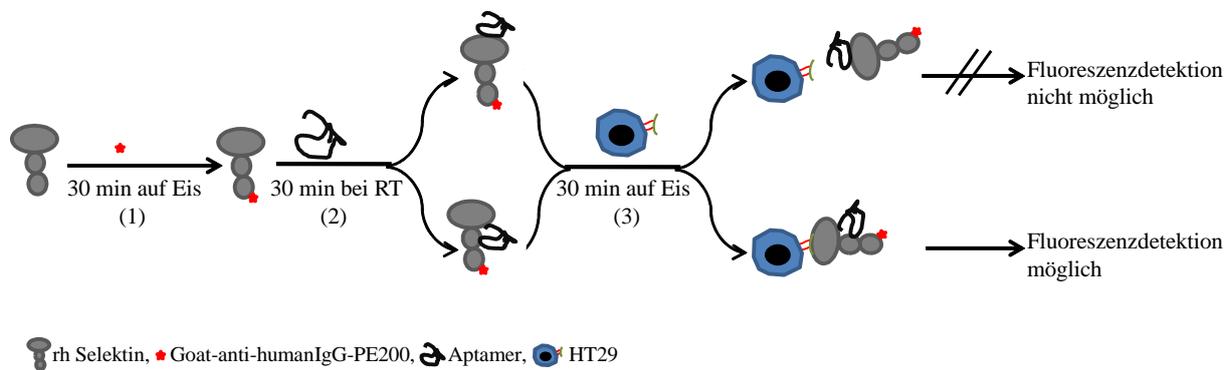


Abbildung 16: Darstellung der durchflusszytometrischen Studien. Rh-Selektin wird für 30 Minuten auf Eis mit Goat-anti-human IgG-PE200 inkubiert. Die somit PE-markiertes Selektin wird im Anschluss für 30 Minuten bei RT mit dem Aptamer inkubiert. Der Aptamer-Selektin-IgG-PE-Komplex wird abschließend 30 Minuten auf Eis mit HT29-Zellen inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht.

3.6.2 LAMINARER-FLUSS-ASSAY

3.6.2.1 INTERAKTION ZWISCHEN SELEKTIN UND SELEKTIN-LIGAND-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

Die Inhibition der Interaktion zwischen rhE- bzw. rhP-Selektin mit Selektin-Ligand-Präsentierenden Zellen durch die selektierten Aptamere unter physiologischen Scher-Bedingungen wurde mittels Laminarer-Fluss-Assay untersucht. Hierfür wurden rh-Selektine an *IBIDI treat microslides-VI* (IBIDI) immobilisiert, indem die schmalen Kapillaren zunächst mit 50 μ L einer 0.02 mg/mL rh-Selektin-DPBS⁺-Lösung für 3 x 30 Sekunden gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert worden sind. In der Kontrollkapilare wurde rhIgG-Fc immobilisiert. Nach nochmaligem Waschen mit 50 μ L DPBS wurde mit 50 μ L Aptamer bzw. Kontroll-DNA (0.15 mg DNA/mL DPBS⁺) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und abschließend erneut gewaschen. Je 1 x 10⁵ Zellen/mL HT29-Zellen wurden dann über die mit rhE-Selektin immobilisierten Kapillaren bzw. EOL-1-Zellen über die mit rhP-Selektin immobilisierten Kapillaren mit einer Flussrate von 8.5 mL/h geleitet und deren Interaktion mit den immobilisierten rh-Selektinen mittels an einem Mikroskop angeschlossenen Recorders aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CapImage 8.5. Abbildung 17 stellt die schematische Darstellung des Laminar-Flow-Assays da.

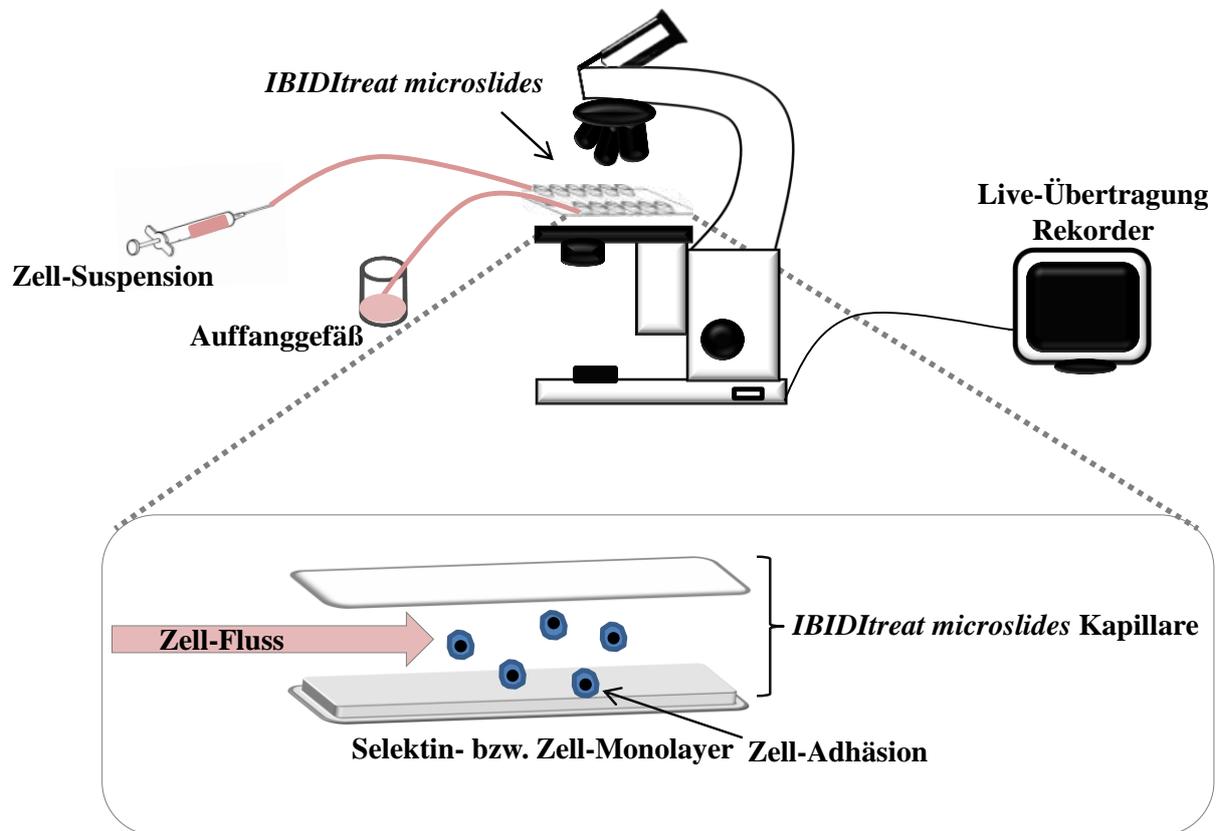


Abbildung 17: Darstellung des Laminar-Flow-Assays. Die Zell-Suspension wird in den Kapillaren des *IBIDItreat microslides* geleitet und deren Interaktion mit den in den Kapillaren immobilisierten Selektine bzw. Zellen wird mittels an einem Mikroskop angeschlossene Rekorders aufgezeichnet.

3.6.2.2 INTERAKTION ZWISCHEN SELEKTIN-PRÄSENTIERENDEN UND SELEKTIN-LIGAND-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

Zur Überprüfung von Zell-Zell-Inhibitionen mittels der selektierten Aptamere wurden humane Lungeneithelzellen (HPMECs) in den Kapillaren der *IBIDItreat microslides-VI* immobilisiert. Hierfür wurden die HPMECs in *Endothelial Cell Growth Medium MV* (inkl. SupplementMix) über die Kapillaren gegeben und über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Induktion der Expression von E-Selektin wurden die immobilisierten Zellen mit 10 ng/mL rhTNF- α für 4 Stunden stimuliert. Anschließend folgte die Inkubation mit den Aptameren bzw. der Kontroll-DNA (0.15 mg DNA/mL *Endothelial Cell Growth Medium MV* inkl. SupplementMix) für 30 Minuten bei 37 °C. Das Durchleiten von HT29-Zellen über die Kapillaren sowie die Analyse der Interaktion erfolgt wie in 3.6.2.1 beschrieben.

3.7 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Zur Vermeidung von Kontaminationen fanden alle zellbiologischen Arbeiten unter sterilen Bedingungen statt. Um Zellschädigungen durch Kälte zu verhindern und zur Aufrechterhaltung des physiologischen Milieus wurden alle Substanzen, die in direktem Kontakt mit den Zellen stehen, vor Zugabe auf 37 °C temperiert. Zudem wurden Medien oder Substanzen nie direkt auf die Zellen selbst, sondern an einen nicht bewachsenen Rand des Kulturgefäßes pipettiert, um wachsende oder bereits gebildete Zellmonolayer nicht zu zerstören. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

3.7.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die adhärent-wachsende humane Darmepithelzelllinie HT29 wurde in RPMI-1640-Medium mit Zusätzen (10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert.

Die adhärent-wachsenden primären humanen Lungenepithelzellen HPMECs wurde in speziellem Endothelial Cell Growth medium MV (inkl. SupplementMix) kultiviert. Für alle zellbiologischen Versuche wurden HPMECs aus den ersten sechs Passagen eingesetzt, da sie aufgrund von Zellseneszenz mit zunehmender Kultivierungsdauer die Fähigkeit zur Expression von E-Selektin einbüßen.

Zellen der humanen eosinophilen Leukämiezelllinie EOL-1 wurden als Suspensionszellen in RPMI 1640 Medium inklusive Zusätzen (10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert.

Ein Medienwechsel erfolgte bei allen Zelllinien alle 2 - 3 Tage.

3.7.2 PASSAGIEREN ADHÄRENTER ZELLEN

Das Ablösen der adhärent-wachsenden HT29-Zellen von ihrer Adhäsionsfläche erfolgte mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung. Hierfür wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt, die Zellen einer T75-Zellkulturflasche mit 2 mL RPMI-1640 gewaschen, mit 2 mL Trypsin/EDTA überschichtet und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 3 mL RPMI-1640 (inkl. 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) wurde das Trypsin deaktiviert.

Die Zellsuspension wurde bei 500 rcf für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden abschließend in dem entsprechendem Puffer bzw. Medium resuspendiert. Die HPMECs wurden mit einem käuflich erworbenen *DetachKit* nach Herstellerangaben abgelöst, bei 500 rcf für 5 Minuten zentrifugiert und die gewünschte Zellzahl in *Endothelial Cell Growth Medium MV* (inkl. SupplementMix) aufgenommen.

3.7.3 CRYOKONSERVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Zur Cryokonservierung wurden adhärente Zellen wie unter 3.7.2 beschrieben vom Kulturflaschenboden abgelöst und nach der Zentrifugation in einem definierten Volumen an Medium aufgenommen. Suspensionszellen wurden ebenfalls durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend zur Zellzahlbestimmung in Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch eine Trypanblau-Färbung mikroskopisch mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Stammhaltung wurden 1×10^6 Zellen in einem Milliliter *freezing medium* (Cryo-SFM) aufgenommen und in einer Cryo-Einfrierbox (Carl Roth) mittels Isopropanol langsam zur Langzeitlagerung auf -80 °C abgekühlt.

4 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Selektion E-Selektin-spezifischer DNA-Aptamere und deren Charakterisierung. Mittels des SELEX Prozesses wurden DNA Moleküle angereichert, die in der Lage waren, an humanes E-Selektin zu binden. Neben der Bindung wurde zudem auch deren Fähigkeit zur Inhibierung der Interaktion des E-Selektins mit seinen Liganden beurteilt. Außerdem konnte auch die Bindung der Aptamere an humanes P-Selektin sowie murine Selektine nachgewiesen werden.

4.1 SELEKTION RHE-SELEKTIN-SPEZIFISCHER DNA-APTAMERE UND CHARAKTERISIERUNG DER ANGEREICHERTEN DNA-BIBLIOTHEK

4.1.1 NACHWEIS DER RHE-SELEKTIN-BIOTINYLIERUNG

Für die Selektion rhE-Selektin-spezifischer DNA-Aptamere musste zunächst das Zielprotein immobilisiert werden. Dafür wurde rhE-Selektin mittels des Biotinylierungsreagenz Sulfon-NHS-LC-Biotin an seinen primären Aminogruppen der Lysinseitenketten und an seinem N-Terminus biotinyliert (3.1.1.1) und anschließend an Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads (Dynabeads[®]) immobilisiert (3.1.1.1). Der Erfolg der Biotinylierungsreaktion wurde mittels Dot-Blot kontrolliert (3.1.2.2). Dabei wurde das auf das Protein übertragene Biotin mittels ExtraAvidin nachgewiesen, welches mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert war. Durch die Umsetzung von Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) mit AP kommt es zur Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), wobei das entstandene unlösliche NBT-Formazan zu einem Farbumschlag führt.

Abbildung 18 A zeigt den Nachweis der Biotinylierungsreaktion an rhE-Selektin mittels Dot-Blot. Zu sehen sind die Biotinspots des rhE-Selektins vor und nach der Dialyse auf der Nitrocellulose-Membran, das unbehandelte Kontrollprotein zeigt keinen Farbumschlag.

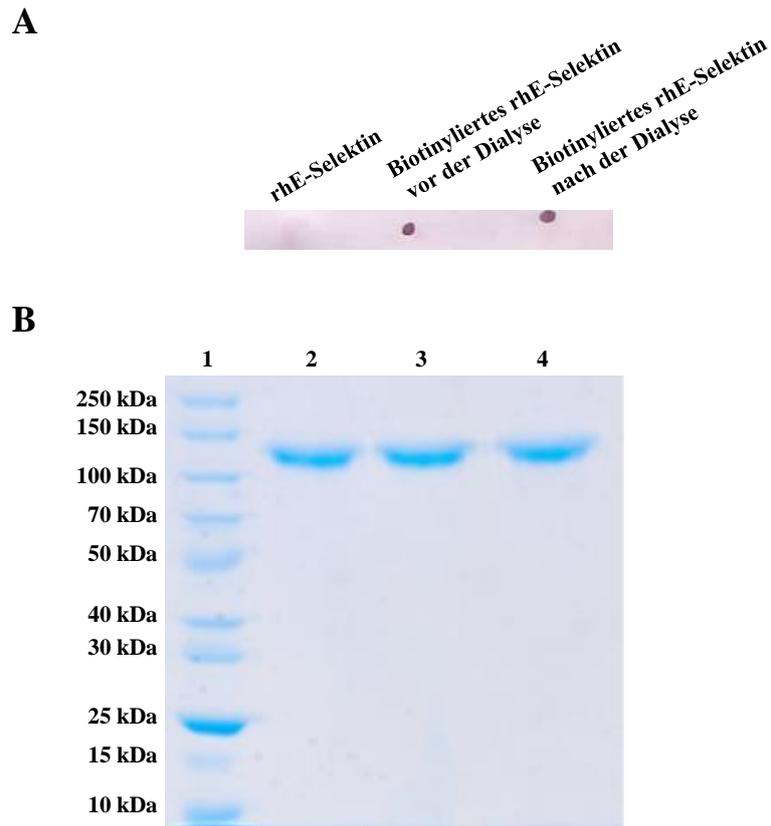


Abbildung 18: Nachweis der Biotinylierungsreaktion an rhE-Selektin mittels Dot-Blot und SDS-PAGE. (A) Dargestellt sind die mittels ExtraAvidin detektierten Biotinspots des rhE-Selektins auf einer Nitrocellulose-Membran sowie (B) die jeweiligen durch Coomassie-Brilliant-Blau-gefärbten Proteinbanden des unbehandelten rhE-Selektins (Spur 2) bzw. des biotinylierten rhE-Selektins vor bzw. nach der Dialyse (Spur 3 bzw. 4). (7.5%iges SDS-PAA-Gel; Spur 1: PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder).

Um eine eventuelle Degradation des rhE-Selektins durch die Biotinylierung ausschließen zu können, wurde die nicht biotinylierte Probe (Abbildung 18 B, Spur 2), die biotinylierte nicht dialysierte Probe (Spur 3) sowie die biotinylierte und durch Dialyse gereinigte Probe (Spur 4) auf ein 7.5%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen und nach der elektrophoretischen Separation analysiert (3.1.2.3). Dabei konnte in allen drei Proben eine Proteinbande in Höhe von 130 kDa mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung detektiert werden. Es waren keine anderen Banden nach der Trennung im Gel nachweisbar, so dass eine Proteindegradation während der Biotinylierungsreaktion ausgeschlossen werden konnte.

Das biotinylierte Protein konnte anschließend auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads immobilisiert werden.

4.1.2 *IN VITRO* SELEKTION VON SELEKTIN-BINDENDEN DNA-APTAMEREN

Die *in vitro* Selektion von DNA-Aptameren mit spezifischer Affinität für rhE-Selektin wurde wie in Abbildung 13 dargestellt durchgeführt (3.3). Jedem Selektionsschritt ging eine Prä-Selektion voraus. Hierfür wurden die einzelsträngigen DNA Moleküle zunächst mit Prä-Selektionsbeads inkubiert und anschließend die gebundene von der nicht gebundenen DNA mittels magnetischer Separation getrennt. Der erhaltene Überstand aus der Prä-Selektion wurde mit den biotinylierten Target-Beads inkubiert, die gebundene von der nicht gebundenen DNAs durch magnetische Separation getrennt, wobei durch Zunahme der Waschschriffe der Selektionsdruck für die Target-Beads pro Runde erhöht wurde. In Tabelle 29 sind die für die PCR eingesetzten DNA-Konzentrationen sowie die Anzahl der Zyklen und Waschschriffe angegeben.

Tabelle 29: Übersicht wichtiger Charakteristika der durchgeführten Selektionsrunden 1 - 17.

Runde	ssDNA (pmol)	rhE-Selektin (pmol)	Waschschriffe	PCR-Zyklen
1	250	50	1 x 200 µL	12
2	20	50	2 x 200 µL	10
3	20	50	3 x 200 µL	10
4	20	50	4 x 200 µL	10
5	20	50	5 x 200 µL	10
6	16	50	6 x 200 µL	8
7	16	50	7 x 200 µL	10
8	21	50	8 x 200 µL	8
9	18	50	9 x 200 µL	9
10	19	50	10 x 200 µL	11
11	15	50	11 x 200 µL	13
12	16	50	12 x 200 µL	7
13	12	50	13 x 200 µL	12
14	12	50	14 x 200 µL	8
15	10	50	15 x 200 µL	6
16	9	50	16 x 200 µL	7
17	8	50	17 x 200 µL	12

Die im Anschluss erfolgte Hitze-Elution diente der Denaturierung des rhE-Selektins und zur Ablösung der gebundenen DNA. Der Überstand wurde mittels magnetischer Separation getrennt, die sich in dem Überstand befindende DNA mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt über eine native PAGE analysiert (3.2.3.1). Abbildung 19 stellt exemplarisch ein solches natives PAA-Gel da. Das PCR-Produkt wurde dabei ohne (Spur 3 und 5) und mit Streptavidin (Spur 2 und 4) auf das Gel aufgetragen. Der Zusatz der Streptavidin-Probe dient dabei als Kontrolle zur Veranschaulichung des Vorhandenseins an Biotin-modifiziertem Rev-Pimer. Mittels Ethidiumbromid-Färbung konnten das Produkt der PCR das 5' Biotin-dsDNA, bei ca. 100 bp, die durch 5'-Biotin-dsDNA und Streptavidin entstandene Bande bei ca. 200 bp und das Primer-Dimer bei ca. 50 bp detektiert werden.

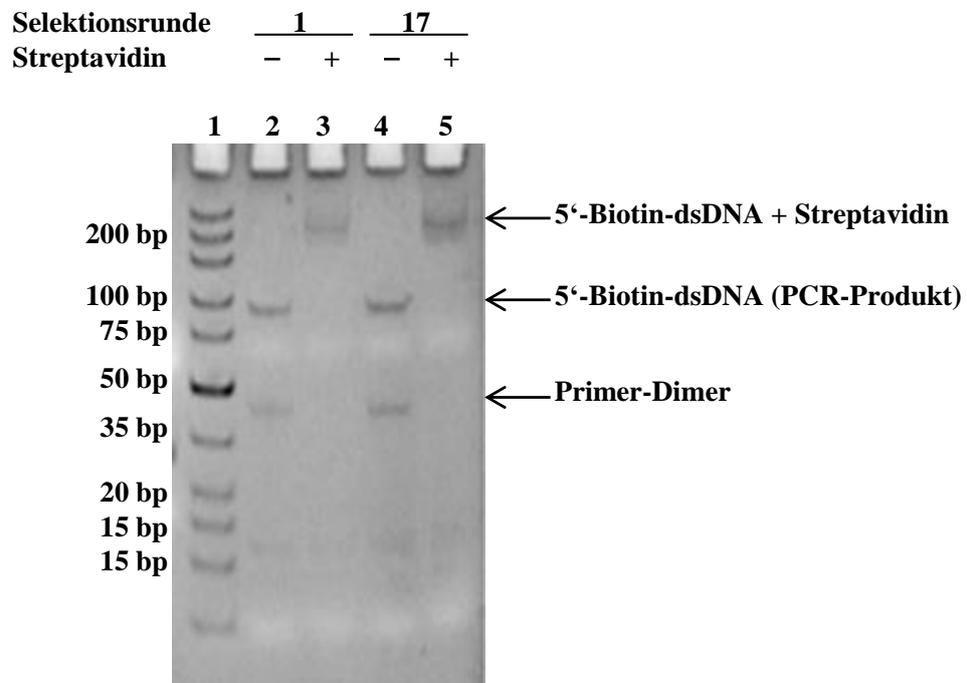


Abbildung 19: Nachweis der PCR-Reaktionen. Spur 1: O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, Spur 2-3: PCR-Produkte nach der Selektionsrunde 1 ohne (2) und mit (3) Streptavidin; PCR-Produkt nach der Selektionsrunde 17, ohne (4) und mit (5) Streptavidin. Die Banden oberhalb von 200 bp entstehen durch die Bindung von 5'-Biotin-dsDNA an Streptavidin. Die Banden bei ca. 100 bp entsprechen dem erwarteten PCR-Produkt. Bei ca. 50 bp sind die während der PCRs entstandenen Primer-Dimere zu erkennen (natives 10%iges PAA-Gel).

Die 5'-biotinylierte dsDNA wurde für die jeweils nächste Prä-Selektionsrunde mittels DNA-Strangtrennung in ssDNA überführt.

4.1.3 CHARAKTERISIERUNG DES BINDUNGSVERHALTENS DER ANGEREICHERTEN DNA-BIBLIOTHEK

Nach SELEX-Runde 17 wurde, in Anbetracht der Mengen der eingesetzten ssDNA und der Anzahl an Waschschrritten sowie der Tatsache, dass nach 12 PCR-Zyklen ein PCR-Produkt erhalten wurde, davon ausgegangen, dass die DNA-Bibliothek hinreichend angereichert worden war. Daraufhin wurde die relative Anreicherung der Selektionsrunde 17 im Vergleich zur Runde 1 mittels Filter-Retentions-Assay quantifiziert (3.5.1). Die hierfür notwendige radioaktiv markierte DNA ergab sich nach Phosphorylierung des 5'-Endes mittels T4-PNK und γ -[³²P]-ATP. Das erhaltene radioaktiv markierte Produkt wurde mittels denaturierender PAGE nachgewiesen (3.2.3.2). Anschließend erfolgte eine Diffusionselution (3.2.3.4) und Isopropanolpräzipitation (3.2.3.5), um überschüssiges γ -[³²P]-ATP abzutrennen. Abbildung 20 zeigt die radioaktiv markierte und mittels denaturierender PAGE gereinigte ssDNA aus den Selektionsrunden 1 und 17, die aufgrund ihres identischen Molekulargewichtes das gleiche Laufverhalten zeigen.



Abbildung 20: Nachweis der mittels PNK-Reaktion radioaktiv markierten Nucleinsäuren. Mittels T4-PNK wurden die einzellsträngigen Nucleinsäuren aus den Selektionsrunden 1 und 17 am 5'-Ende radioaktiv markiert.. Spuren 1 und 2 zeigen die gereinigte 5'-[³²P]-ssDNA aus den Selektionsrunden 1 und 17. (denaturierendes 10%iges PAA-Gel)

Die präparierte radioaktiv markierte ssDNA aus beiden Selektionsrunden wurde anschließend in einem Filter-Retentions-Assay (Abbildung 15) auf ihre Affinität für rhE-Selektin getestet. Zu diesem Zweck wurde eine konstante Menge an 5'-[³²P]-ssDNA (< 0.1 μ M) mit steigenden rhE-Selektin Konzentrationen (0 – 1 μ M) inkubiert. Die Trennung von den an das Protein gebundenen bzw. nicht gebundenen DNAs erfolgte über eine in KOH vorbehandelte, und somit gegen unspezifische DNA-Bindung abgeschirmte, Nitrocellulose-Membran.⁸⁵ Dabei wurden Proteine und somit auch die an das Protein gebundenen DNA Moleküle auf der Membranoberfläche zurückgehalten, während die nicht an das Protein gebundenen DNAs die Membranschicht passierten (Abbildung 21 B). Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze des radioaktiven Isotops [³²P], welches an das 5'-Ende des DNAs eingebaut wurde, konnten die auf der Membran zurückgehaltenen DNAs im Anschluss detektiert und somit Rückschlüsse über die Protein-DNA-Interaktion geschlossen werden. Um die höchst mögliche DNA-Protein-Bindung ermitteln zu können, wurde nach der Filtration der DNA-

Proteinverdünnungsreihe eine bestimmte Menge der in der Analyse eingesetzten DNA direkt auf die luftgetrocknete Nitrocellulose-Membran pipettiert. Die gesteigerte Affinität der DNA-Bibliothek aus der Selektionsrunde 17 im Vergleich zur Selektionsrunde 1 an rhE-Selektin wurde durch die intensivere Schwärzung, verursacht durch die an rhE-Selektin gebundenen radioaktiv markierten Proben, detektiert.

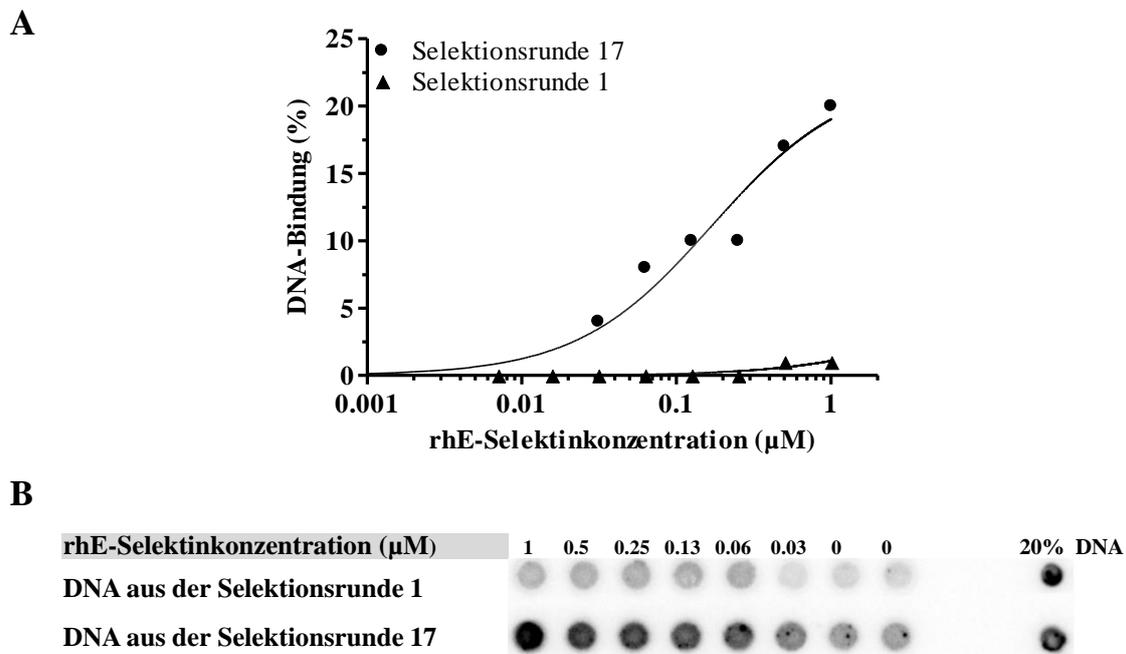


Abbildung 21: Ermittlung der DNA-Protein-Interaktion der angereicherten DNA-Bibliothek aus den Selektionsrunden 1 und 17 mittels Filter-Retentions-Assay. (A) Logarithmische Auftragung der mittels FRA ermittelten prozentualen DNA-Bindung in Abhängigkeit der rhE-Selektin Konzentration. Die DNA aus der Selektionsrunde 17 zeigt bei einer rhE-Selektin-Konzentration von 1 µM eine maximale Bindung von ca. 20% mit einem K_d -Wert von ca. 170 nM. (B) Die radioaktiv markierten einzelsträngigen DNA Moleküle (< 0.1 µM) aus den Selektionsrunden 1 und 17 wurden mit steigenden Mengen rhE-Selektin (0.03 – 1 µM) inkubiert, über eine in KOH vorbehandelte Nitrocellulose-Membran filtriert und autoradiographisch ausgewertet. Für die Berechnung der höchst möglichen DNA-Bindung wurden 20 % der gesamten markierten DNA direkt auf die Membran pipettiert. n = 1

Abbildung 21 B zeigt die unterschiedlichen Intensitäten der erhaltenen Signale, die mit höher werdender Proteinkonzentration stetig zunahm. Abbildung 21 A quantifiziert die Anreicherung der DNA in den getesteten Selektionsrunden 1 und 17 anhand der DNA-Bindung an das Target rhE-Selektin, welches anhand der erhaltenen Signalstärken aus der Abbildung 21 B ermittelt wurde. Während mit steigender rhE-Selektin Konzentration (0.03 – 1 µM) bei Selektionsrunde 1 keine Bindung an die DNA-Bibliothek (bei 1 µM max. 1% Bindung) nachweisbar war, nahm die Bindung der angereicherten DNA aus Selektionsrunde 17 schon bei gering eingesetzter rhE-Selektin-Konzentration stetig zu. Bei einer Konzentration von ca. 0.1 µM konnte der Wendepunkt der Bindungskapazität

identifiziert werden, so dass bei der höchsten eingesetzten rhE-Selektin-Konzentration von 1 μ M eine maximale Bindung von 20% detektierbar war. Wie es in der Abbildung 21 A zu sehen ist, zeigt die Bindungskurve bei einer rhE-Selektinkonzentration von 1 μ M noch keine vollständige Sättigung der Interaktion zwischen rhE-Selektin und ssDNA aus Selektionsrunde 17.

Die Dissoziationskonstante für die Bindung zwischen DNAs aus der Selektionrunde 17 und rhE-Selektin wurde unter Verwendung des *One-Site-Binding-Modells* (GraphPad Prism[®]) berechnet (3.5.1, Gleichung 2). Somit wurde für die angereicherte DNA-Bibliothek nach der Selektionsrunde 17 eine Dissoziationskonstante von ca. 170 nM errechnet.

4.2 IDENTIFIZIERUNG RHE-SELEKTIN-BINDENDER DNA-APTAMERE

Zur Identifizierung von rhE-Selektin-bindenden DNA-Aptameren wurde der angereicherte und charakterisierte DNA-Pool aus der Selektionsrunde 17 kloniert. Hierfür wurde der Vektor pUC19-T zuvor durch die Restriktionsendonuclease XcmI geschnitten (3.4.1) und mit der dsDNA ligiert (3.4.2) und anschließend durch Elektroporation in *E. coli* transformiert (3.4.4). Die auf LB-Ampicillin-Agar-Platten kultivierten Kolonien (3.4.5) wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.1.2) untersucht. Dabei wurden 48 Kolonien als positiv identifiziert. Abbildung 22 stellt exemplarisch das Ergebnis der Kolonie-PCR für die Kolonien 1 - 9 dar.

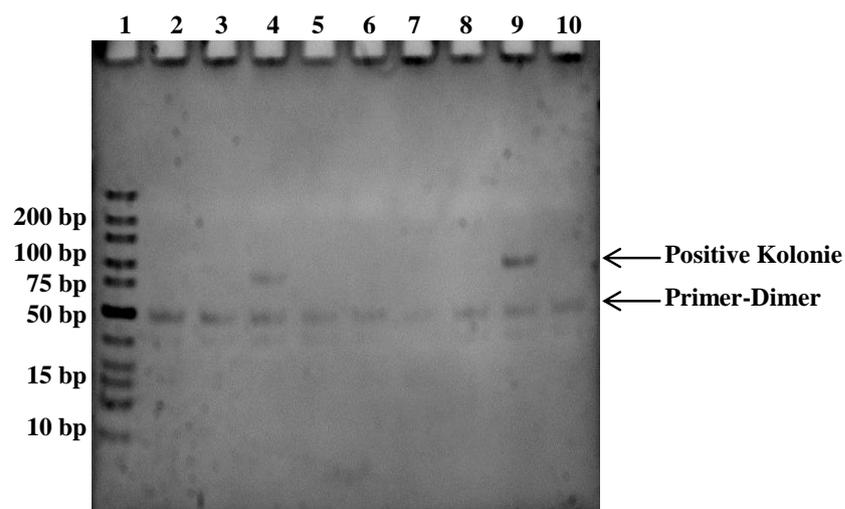


Abbildung 22: Identifizierung positiver (Insert-enthaltenen) Kolonien durch Kolonie-PCR. Spur 1: O'GeneRulerTM Ultra Low Range DNA Ladder, Spur 2 - 10: Produkte aus den Kolonien 1 - 9. Die Banden bei ca. 100 bp weisen das PCR-Produkt und somit die positiven Kolone vor. Bei ca. 50 bp sind die während des PCRs entstandenen Primer-Dimere zu beobachten (natives 10%iges PAA-Gel).

Banden bei etwa 100 bp stellen Kolonien dar, die das PCR-Produkt aufgenommen haben, Banden bei ca. 50 bp repräsentieren die während der PCR entstandenen Primer-Dimere. In diesem Beispiel wurden die Kolonien 3 und 8 als positiv (Insert-enthaltene Kolonien) identifiziert. Aus den Insert-enthaltenden Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt. Dabei wurden insgesamt 30 Sequenzen ermittelt. Mit Hilfe des Programms MegAlign (*Lasergene Software Package, DNASTAR, Version 11*) wurde die Sequenzähnlichkeit innerhalb der 30 Sequenzen ermittelt. Das durch die Anwendung der *Clustal W Method* durchgeführte *Parsimonius Alignment* ergab den in der Abbildung 23 dargestellten phylogenetischen Baum.

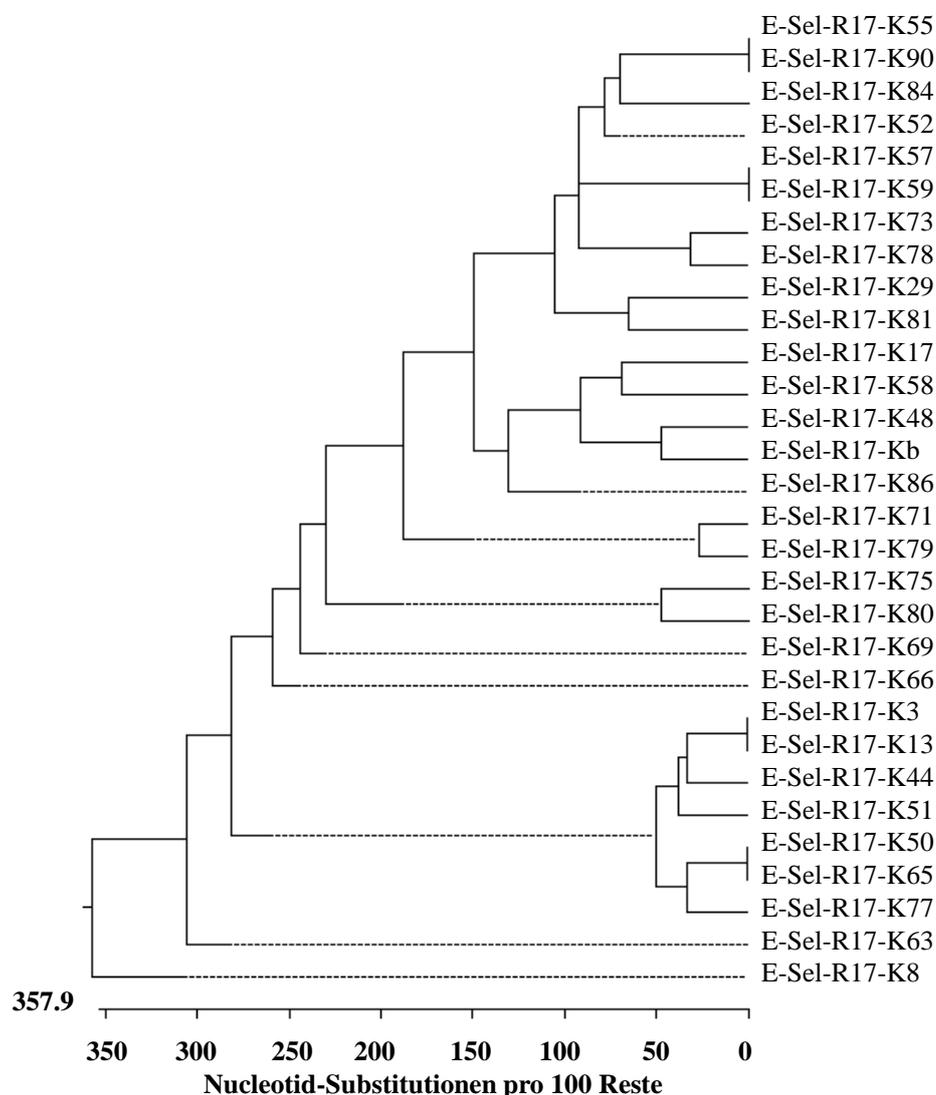


Abbildung 23: Darstellung von Sequenzähnlichkeiten mittels eines phylogenetischen Baums. Die durch die Sequenzierung erhaltenen 30 Sequenzen aus der Selektionsrunde 17 wurden mit der *Clustal Method* aus dem Programm *MegAlign* (Version 6.1) dargestellt. Zu sehen sind die Sequenzen unterteilt in ihren Diversitäten zu einander. Da das Programm ursprünglich von Aminosäuren ausgeht, sind auf der x-Achse Nucleotid-Substitutionen pro 100 Reste definiert.

Dabei wurden die Sequenzpaare und Sequenz-Bereiche, die untereinander ähnlich waren, optimal in Abhängigkeit von der Sequenz-Diversität (Nucleotid-substitutionen pro 100 Reste) angeordnet. Aus dem gewurzelten phylogenetischen Baums gehen zwei Hauptadern hervor, wobei die eine aus nur einer Sequenz besteht, während die andere Ader sich erneut teilt. Aus dem *Alignment* konnten keine Indizien auf eine Anreicherung eines bestimmten DNA-Moleküls abgeleitet werden. Vier Sequenzen waren jeweils zweimal vorhanden.

Da die Anreicherung eines DNA-Moleküls anhand der Sequenzhäufigkeit nicht ermittelt werden konnte, wurden 14 der erhaltenen Oligonucleotide käuflich erworben und 13 weitere Oligonucleotide mittels PCR aus den entsprechenden Plasmiden amplifiziert und mittels FRA auf ihre rhE-Selektin-Affinität hin überprüft. Dabei konnten drei rhE-Selektin-bindende DNA-Aptamere identifiziert werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: rhE-Selektin-bindende DNA-Aptamere. Die Primer-Regionen sind fett hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
E-Sel-R17-K29	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC CGCGAATTCGTGTCTACTAAACACCGATA GTTTCGATTGTCTTTGGTTCAT CATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K78	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC TCGCACGGAGAGGTGCGAAAGTGTATGC ACTAGTGGGGGAATGGCGG CATGCTTATTCTTGTCTCCC
E-Sel-R17-K86	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC GATTTGGATTTGGGGTGGAGGGTATGGT TTGTGCTGGCGTTCTCATTTC CATGCTTATTCTTGTCTCCC

Während die DNA-Aptamere E-Sel-R17-K29 und E-Sel-R17-K86 einen randomisierten Bereich von 50-Nucleotiden aufwiesen, bestand dieser randomisierte Bereich bei E-Sel-R17-K78 nur aus 48 Nucleotiden. Diese von der ursprünglich eingesetzten DNA-Bibliothek abweichende Anzahl der Nucleotide im randomisierten Bereich kann auf eine falsche Amplifikation des Stranges während der PCR zurückgeführt werden. Aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit der Bindung zwischen E-Sel-R17-K78 und rhE-Selektin wurde das Hauptaugenmerk auf die beiden anderen Aptamere gerichtet. Die DNA-Aptamere E-Sel-R17-K29 und E-Sel-R17-K86 wurden als Selektin bindende DNNA-Aptamere SDA1 und SDA2 bezeichnet.

4.3 CHARAKTERISIERUNG IDENTIFIZIERTER RHE-SELEKTIN-SPEZIFISCHEN-DNA APTAMERE

4.3.1 ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER VERWENDETEN PROTEINE

Die in den Bindungsstudien eingesetzten Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE (3.1.2.3) auf ihre Reinheit überprüft. Wie in Abbildung 24 A zu sehen ist, wurde für das rmE-Selektin eine Bande bei etwa 110 kDa, für das rhE-Selektin eine Bande bei etwa 120 kDa und für die rm bzw. rhP-Selektin Banden auf der Höhe von etwa 130 bzw. 140 kDa detektiert. Ebenfalls wurde auf einem 15%igen SDS-PAA-Gel bei etwa 15 kDa das Kontroll-Protein Streptavidin detektiert (Abbildung 24 B).

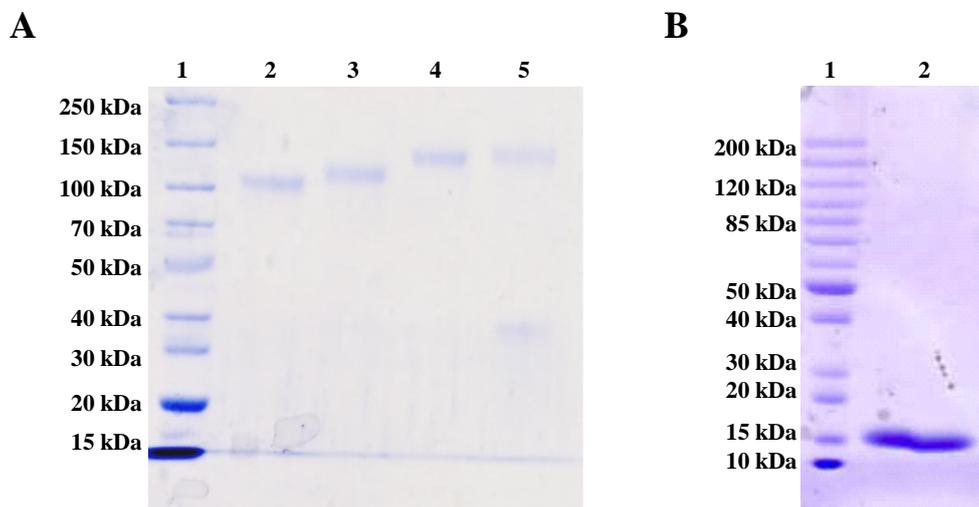


Abbildung 24: Reinheitsbestimmung von den in den Bindungsstudien verwendeten Proteinen mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. (A) Dargestellt sind die auf einem 7.5%igen SDS-PAA-Gel detektierten humanen und murinen Selektine. Das rmE-Selektin ist bei etwa 110 kDa, das rhE-Selektin bei etwa 120 kDa, das rmP-Selektin bei etwa 130 kDa und das rhP-Selektin bei etwa 140 kDa zu beobachten. Das Molekulargewicht wurde mittels PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (M) ermittelt. (B) Das Kontroll-Protein Streptavidin wurde mittels einem 15%igen SDS-PAA-Gel detektiert. Das Molekulargewicht von etwa 15 kDa wurde durch den Vergleich mit PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (M) ermittelt.

4.3.2 UNTERSUCHUNG DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN SELEKTIERTER APTAMERE

4.3.2.1 DNA-APTAMER SDA1

Das identifizierte Selektin-Aptamer SDA1 wurde mittels FRA (3.5.1) näher untersucht. Abbildung 25 zeigt exemplarisch die Auswertung eines durchgeführten FRA für das Aptamer.

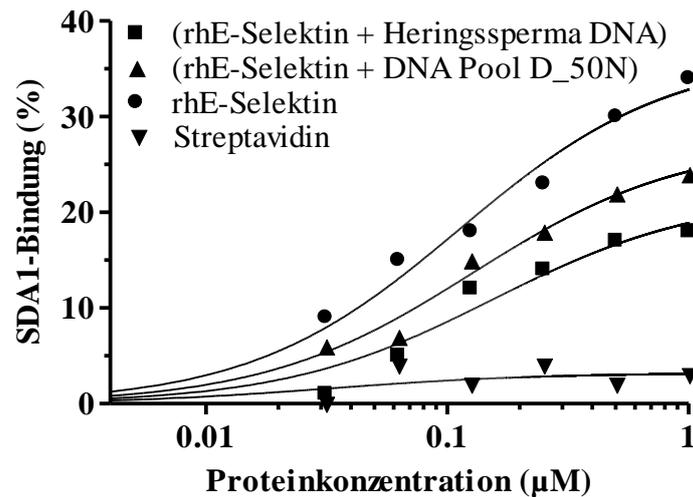


Abbildung 25: Auswertung der SDA1-Protein-Interaktion mittels Filter-Retentions-Assay. Logarithmische Auftragung der prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA1 (<math>< 0.1 \mu\text{M}</math>) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0.03 – 1 μM). Die spezifische Interaktion von SDA1 mit rhE-Selektin wurde in Abwesenheit und in Anwesenheit von 250 nM Heringsperma DNA bzw. von 500 nM DNA Pool D_50N analysiert. SDA1 band nicht an das Kontroll-Protein Streptavidin. $n = 1$.

Abhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration (0.03 – 1 μM) wurden 9 – 34% Bindung von SDA1 an rhE-Selektin detektiert. Die grafische Darstellung der Ergebnisse zeigt dabei eine stetige Zunahme der Bindung mit steigender Proteinkonzentration (Abbildung 25 ●). Durch Konkurrenz mit 250 nM Heringsperma-DNA bzw. 500 nM DNA Pool D_50N wurde die Spezifität der Bindung zwischen SDA1 und rhE-Selektin überprüft. Trotz des Konzentrationsüberschusses an unspezifischer Heringsperma DNA bzw. DNA Pool D_50N konnte eine rhE-Selektin konzentrationsabhängige Bindung von SDA1 an rhE-Selektin detektiert werden, die bei der eingesetzten Höchstkonzentration des Proteins bei 1 μM immer noch auf 18% bzw. 24% quantifiziert werden konnte (Abbildung 25 , ■, ▲). Die proteinspezifische Affinität von SDA1 an rhE-Selektin wurde durch den Einsatz von Streptavidin ermittelt. Hierbei wurde keine Interaktion und damit keine spezifische Bindung zwischen SDA1 und Streptavidin über den gewählten Konzentrationsbereich detektiert (Abbildung 25 ▼).

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen E- und P-Selektin wurde ebenfalls die Affinität von SDA1 für rhP-Selektin mittels FRA untersucht (Abbildung 26). Hier konnte eine geringe Bindung von maximal 6% detektiert werden.

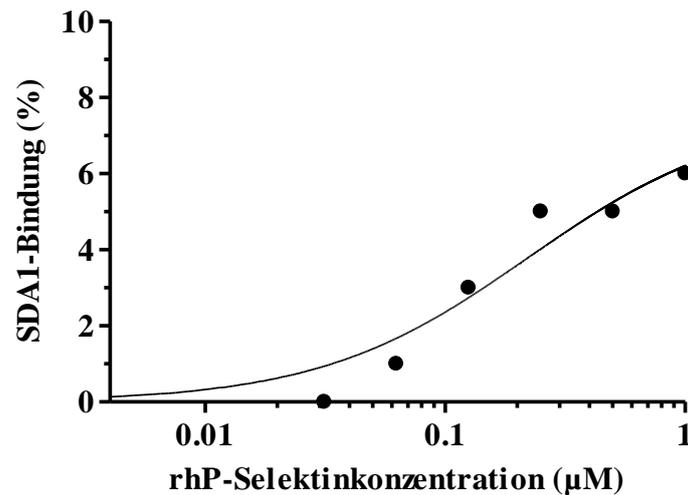


Abbildung 26: Auswertung der Interaktion zwischen SDA1 und rhP-Selektin mittels Filter-Retention-Assay. Logarithmische Auftragung der prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA1 in Abhängigkeit von der rhP-Selektin Konzentration. Das radioaktiv markierte SDA1 (< 0,1 µM) wurde mit steigender rhP-Selektin Konzentration (0,03 – 1 µM) inkubiert, über eine in KOH vorbehandelte Nitrocellulose-Membran filtriert und autoradiographisch ausgewertet. (Durchgeführt von Dr. Magbanua). n = 1.

Für die Interaktion zwischen SDA1 und rhE-Selektin wurde unter Verwendung des *One-Site-Binding*-Modells (GraphPad Prism) eine Dissoziationskonstante (K_d) von 87 ± 12 nM bei einer maximalen Bindung von $19 \pm 0,7\%$ errechnet (Abbildung 27 ●). Ebenfalls konnte ein K_d -Wert von 84 ± 20 nM bei einer maximalen Bindung von $5 \pm 0,8\%$ für die Bindung von SDA1 an rhP-Selektin ermittelt werden (Abbildung 27 ■). Eine Bindung der unspezifischen Kontroll-DNA an rhE bzw. rhP-Selektin sowie eine Bindung von SDA1 an das Kontroll-Protein Streptavidin konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 27 ▼, ◆, ▲).

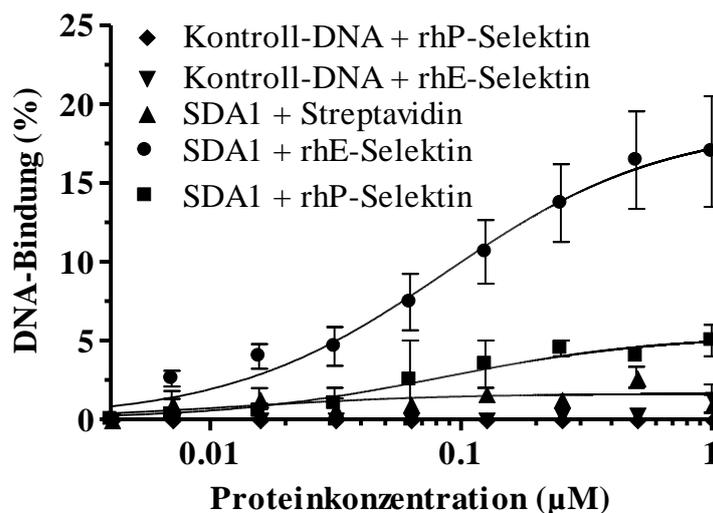


Abbildung 27: Ermittlung der Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen SDA1 und rhE- bzw. rhP-Selektin mittels FRA. Logarithmische Auftragung der prozentualen SDA1-Bindung in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration (0,01 – 1 µM) mit Standardabweichungen. Für die Bindung von SDA1 an rhE-Selektin konnte ein K_d -Wert von 87 ± 12 nM und für die Bindung an rhP-Selektin ein K_d -Wert von 84 ± 20 nM bestimmt werden. Eine Bindung an das Kontroll-Protein Streptavidin sowie an die Kontroll-DNA war nicht nachweisbar. n = 3.

Aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen humanen und murinen Selektinen und der Tatsache, dass die Selektine beider Spezies unter anderem auch die gleichen Bindungspartner besitzen, wurde auch die Interaktion der selektierten DNA-Aptamere mit murinem E- und P-Selektin (rmE und rmP) analog zu den vorherigen Experimenten überprüft. Abbildung 28 zeigt die graphische Auswertung der Interaktion zwischen SDA1 und den murinen Selektinen. Die ermittelte Bindung zeigt im Vergleich zu der Bindung an humane Selektine bei gleicher eingesetzter Proteinkonzentration eine höhere prozentuale Bindung. Eine Ermittlung der Dissoziationskonstante konnte jedoch nicht erfolgen, da eine Sättigung der Bindung nicht erreicht wurde.

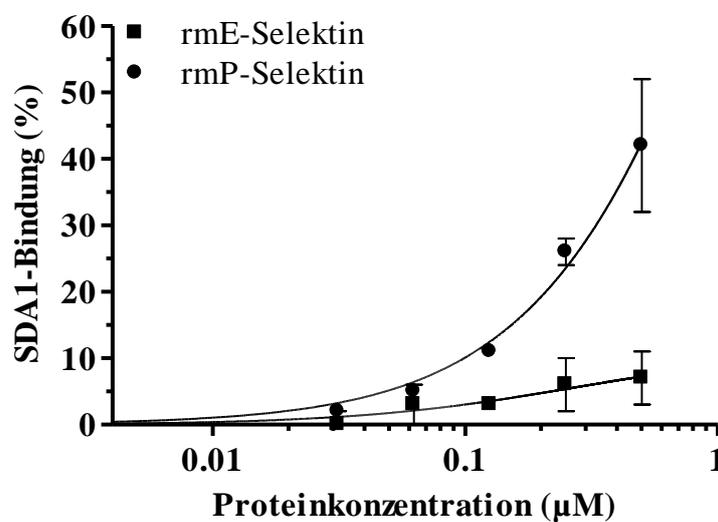


Abbildung 28: Auswertung der SDA1-Bindung an murines E- und P-Selektin. Logarithmische Auftragung der prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA1 (<math>< 0.1 \mu\text{M}</math>) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0.01 – 0.5 μM) mit Standardabweichungen. $n = 2$.

4.3.2.2 DNA-APTAMER SDA2

Für das Aptamer SDA2 wurde analog zu SDA1 die Spezifität der Bindung an rhE-Selektin ermittelt (Abbildung 29). Mittels FRA (3.5.1) konnte eine rhE-Selektinkonzentrationsabhängige (0.01 – 1 μM) Zunahme der SDA2-Bindung zwischen 2 und 17% berechnet werden. Die graphische Darstellung der Interaktion zwischen SDA2 und rhE-Selektin zeigt eine stetige Zunahme der Bindung mit steigender rhE-Selektinkonzentration (Abbildung 29 ●).

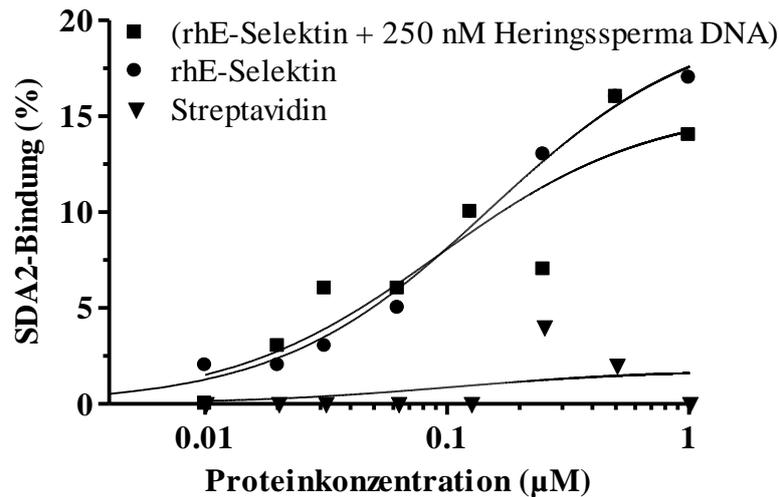


Abbildung 29: Auswertung der SDA2-Protein-Interaktion mittels Filter-Retentions-Assay. Logarithmische Auftragung der prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA2 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0.01 – 1 µM). Die spezifische Interaktion von SDA2 mit rhE-Selektin wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von 250 nM Heringssperma DNA analysiert. Eine Bindung von SDA2 an das Kontroll-Protein Streptavidin konnte ausgeschlossen werden (Spur 3). n = 1.

Die Kompetitionsstudien zur Ermittlung der Spezifität der Interaktion zwischen SDA2 und rhE-Selektin wurde in Anwesenheit von 250 nM Heringssperma DNA durchgeführt. Dabei wurde abhängig von der rhE-Selektinkonzentration eine Bindung zwischen SDA2 und rhE-Selektin von 0 – 14% (Abbildung 29 ■) ermittelt. Zur Kontrolle der Spezifität der Bindung wurde die Interaktion zwischen SDA2 und als Kontrolle eingesetzte Streptavidin überprüft. Eine Bindung von SDA2 an Streptavidin war nicht nachweisbar (Abbildung 29 ▼).

Außerdem konnte eine Bindung zwischen SDA2 und rhP-Selektin mittels FRA detektiert werden (1 – 10%). Abbildung 30 zeigt die Proteinkonzentrationsabhängige Interaktion zwischen SDA2 und rhP-Selektin.

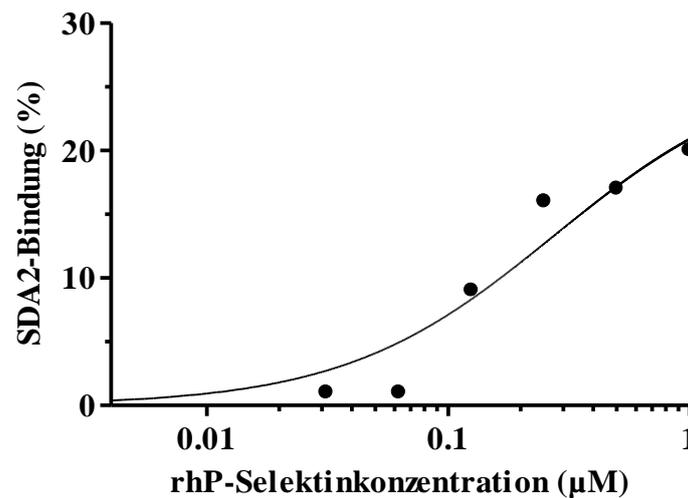


Abbildung 30: Auswertung der Interaktion zwischen SDA2 und rhP-Selektin mittels Filter-Retention-Assay. Logarithmische Auftragung der prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA2 (< 0,1 µM) in Abhängigkeit von der rhP-Selektin-Konzentration (0,01 – 1 µM). Durchgeführt von Dr. Magbanua, n = 1.

Analog zu SDA1 wurde mittels *One-Site-Binding-Model* (GraphPad Prism[®], Gleichung 2) ein K_d -Wert von 97 ± 15 nM mit einer maximalen Bindung von $17 \pm 0,8\%$ für die Bindung zwischen SDA2 und rhE-Selektin (Abbildung 31●) und ein K_d -Wert von 95 ± 18 nM bei einer maximalen Bindung von $23 \pm 1,3\%$ für die Bindung zwischen SDA2 und rhP-Selektin errechnet (Abbildung 31■).

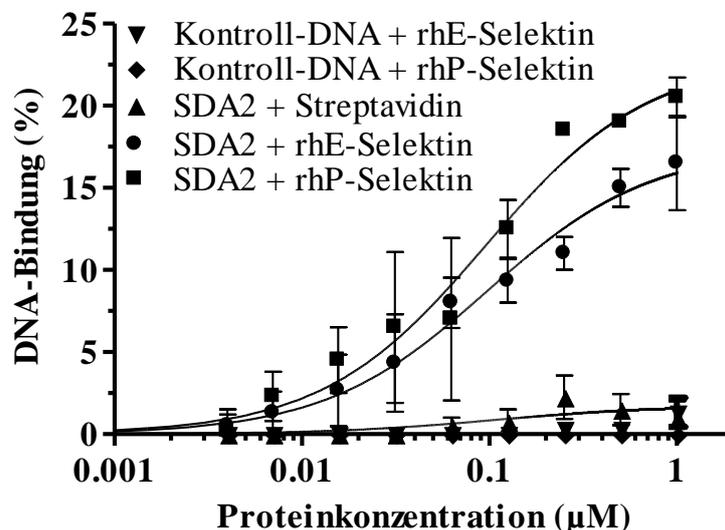


Abbildung 31: Ermittlung der Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen SDA2 und rhE- bzw. rhP-Selektin mittels FRA. Logarithmische Auftragung der prozentualen SDA2-Bindung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0,01 – 1 µM) mit Standardabweichungen. Für die Bindung von SDA2 an rhE-Selektin konnte ein K_d -Wert von 97 ± 15 nM, für die Bindung an rhP-Selektin ein K_d -Wert von 95 ± 18 nM bestimmt werden. Eine Bindung an das Kontroll-Protein Streptavidin sowie an die Kontroll-DNA war nicht nachweisbar. n = 3.

Auch hier zeigten die durchgeführten Kontrollen keine unspezifischen Interaktionen. Weder eine Bindung zwischen SDA2 und dem als Kontrolle eingesetzten Streptavidin noch eine

Bindung zwischen Kontroll-DNA und rhP- bzw. rhE-Selektin wurde detektiert (Abbildung 31 ▲, ◆, ▼).

Die Untersuchung der Interaktion zwischen SDA2 und murinen Selektinen zeigte, wie auch bei SDA1 beobachtet, eine Bindung zwischen dem Aptamer und rmE- sowie rmP-Selektin (Abbildung 32 ■, ●).

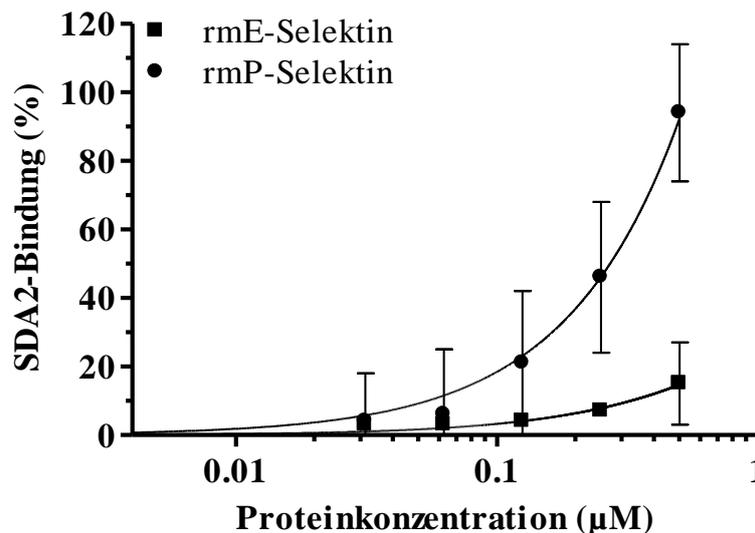


Abbildung 32: Auswertung der SDA2-Bindung an murines E- und P-Selektin. Logarithmische Auftragung der mittels FRA ermittelten prozentualen Bindung des DNA-Aptamers SDA2 (< 0.1 µM) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0.01 – 0.5 µM) mit Standardabweichungen. n = 2.

Die ermittelte Bindung im Vergleich zu der Bindung zwischen SDA2 und humanen Selektinen bei gleicher eingesetzter Proteinkonzentration liegt prozentual höher. Jedoch wurde keine Sättigung der Interaktion zwischen SDA2 und murinen Selektinen erreicht, so dass die Ermittlung der Dissoziationskonstante nicht erfolgen konnte.

4.3.3 SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE

Um eine Aussage über die Faltung der DNA-Aptamere treffen zu können, wurde das Programm *Mfold* (Version 2.3) genutzt. Es ermöglicht eine Strukturvorhersage von einzelsträngigen Nucleinsäuren. Abhängig von den Basenpaarungen und von der entsprechenden minimalen freien Faltungsenergie (ΔG) werden Struktur-Plots möglicher Sekundär-Strukturen des Moleküls generiert und die entsprechende minimale Faltungsenergie ermittelt.⁸⁴

4.3.3.1 STRUKTURVORHERSAGE UND VERKÜRZUNGSVERSUCHE DES DNA-APTAMERS SDA1 MITTELS *MFOLD*

Mittels *Mfold* wurden zwei mögliche Sekundärstrukturen für SDA1 vorhergesagt. Beide Strukturen zeichnen sich durch mehrere kleine *Loops* und *Stems* aus, die sich am Rande eines *Bulges* ausbilden.

SDA1:

GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACCGCGAATTCGTGTCACTAACACCGATAGTTTCGATTGTCTTTGGTTCATCATGCTTATTCTTGTCTCCC

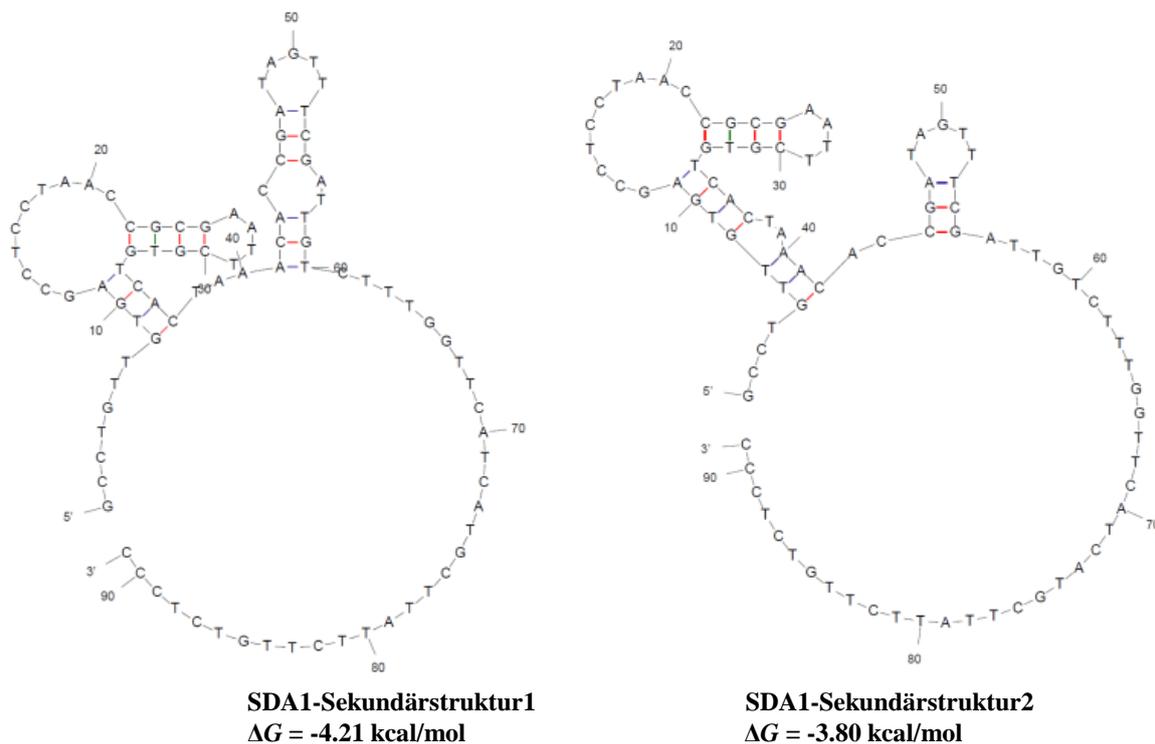


Abbildung 33: *Mfold* Sekundärstrukturvorhersage für SDA1. Dargestellt sind die zwei vom Programm vorgeschlagenen Strukturen des DNA-Aptamers SDA1 mit ihren entsprechenden minimalen freien Faltungsenergien (ΔG).

Abbildung 33 stellt beide erhaltenen Sekundärstrukturen mit den entsprechenden minimalen freien Faltungsenergien (ΔG) dar. Diese beträgt für die SDA1-Sekundärstruktur1 -4.21 kcal/mol bzw. -3.80 kcal/mol für SDA1-Sekundärstruktur 2. Beide vorgeschlagenen Strukturen beinhalten insgesamt vier *Loops* und vier *Stems*. Ein Teil der konstanten Primer-Region, D1-Primer-Fw, liegt innerhalb dieser *Stems* und *Loops*.

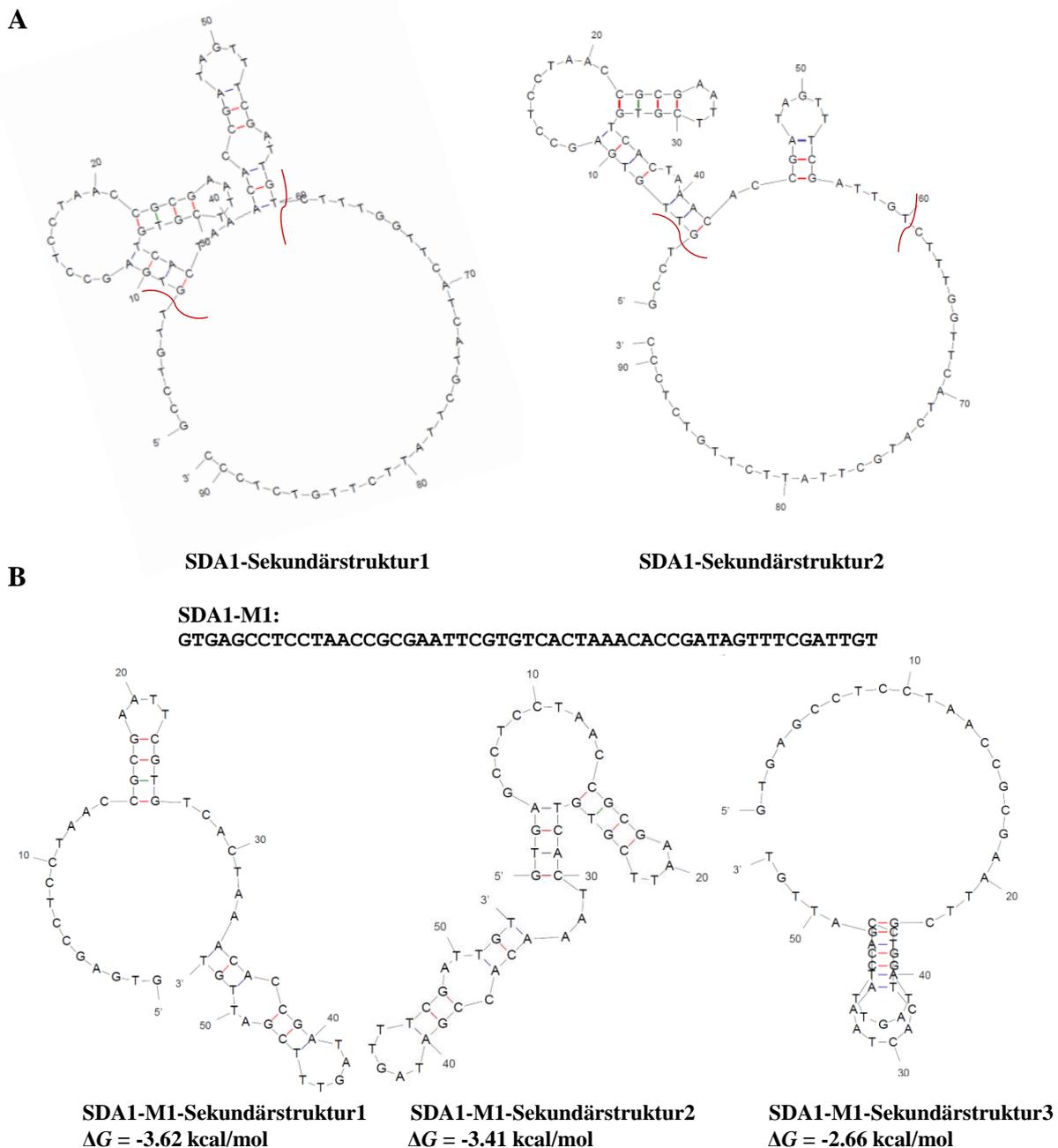


Abbildung 34: Mfold Sekundärstrukturvorhersage für SDA1 und SDA1-M1. (A) Dargestellt sind die zwei vom Programm vorgeschlagenen Strukturen des DNA-Aptamers SDA1. Der Bereich zwischen den rot markierten Schnittstellen entspricht dem verkürzten Molekül SDA1-M1. (B) Drei für SDA1-M1 vorgeschlagene Sekundärstrukturen mit ihren entsprechenden minimalen freien Faltungsenergien (ΔG). Die ersten zwei Strukturen für SDA1-M1 beinhalten die *Loops* und *Stems*, die auch in SDA1 zu beobachten sind.

Die von dem Programm *Mfold* (Version 2.3) ermittelte Sekundärstruktur für SDA1 diene als Grundlage für eine Verkürzung der Aptamere zur Eingrenzung des Bindemotivs (3.5.2). Dazu wurde das 91 nt lange SDA1 zunächst bis zu den *Stem*- und *Loop*-Bereichen am 3'-Ende um 38 nt verkürzt (Abbildung 34 A). Wie in Abbildung 34 B dargestellt bildet das 53 nt lange als SDA1-M1 bezeichnete verkürzte Molekül in allen vorhergesagten Strukturen ebenfalls *Stems* und *Loops* aus. Die minimale freie Faltungsenergie der drei vorhergesagten

Sekundärstrukturen für SDA1-M1 mit -3.62, -3.41 bzw. -2.66 kcal/mol sind niedriger als bei SDA1-Sekundärstruktur1 bzw. SDA1-Sekundärstruktur 2. Die von SDA1-M1-Sekundärstruktur1 bzw. SDA1-M1-Sekundärstruktur2 ausgebildeten *Stems* und *Loops* werden von denselben Basen ausgebildet. Die durchgeführten Bindungsstudien mittels Filter-Retentions-Assay (3.5.1) mit SDA1-M1 ergaben keine Bindung zwischen SDA1-M1 und rhE- bzw. rhP-Selektin.

4.3.3.2 SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE UND VERKÜRZUNGSVERSUCHE DES DNA-APTAMERS SDA2 MITTELS MFOLD

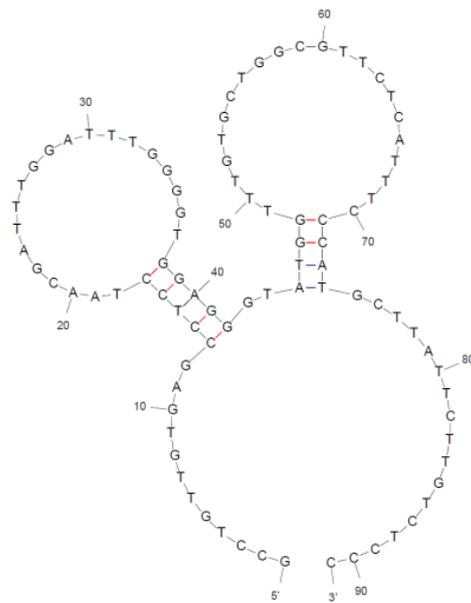
Für das Aptamer SDA2 wurden insgesamt vier verschiedene Strukturvorhersagen mittels *Mfold* (Version 2.3) ermittelt. Analog zu SDA1 bildet auch SDA2 in seiner Sekundärstruktur *Bulges*, *Loops* und *Stems* (Abbildung 35). In den vier vorhergesagten Sekundärstrukturen für SDA2 mit minimalen freien Faltungsenergien (ΔG) von -3.85, -3.26, -3.36 und -2.91 kcal/mol werden insgesamt zwei *Loops* und zwei *Stems* beobachtet, wobei die zweite Struktur einen kleinen *Loop* innerhalb des zweiten *Stems* beinhaltet. Beide *Stems* in den vier vorhergesagten Strukturen beinhalten die beiden Primer-Regionen.

Entsprechend zu SDA1 wurde auch eine Verkürzung des SDA2-Moleküls, basierend auf der von *Mfold* vorgeschlagenen Sekundärstruktur, geprüft. Wie in Abbildung 36 A dargestellt wurde ausgehend von der SDA2-Sekundärstruktur 1 das Aptamer bis zu den zwischen den Positionen 13 und 74 vorhandenen Nucleotiden verkürzt. Für dieses 62 nt lange als SDA2-M1 bezeichnete Molekül wurden zwei Sekundärstrukturen mit minimalen freien Faltungsenergien von -2.63 bzw. -2.9 kcal/mol vorhergesagt (Abbildung 36 B). Sie beinhalten, ähnlich wie der SDA2-Strukturvorhersage1, ebenfalls *Loops* und *Stems*.

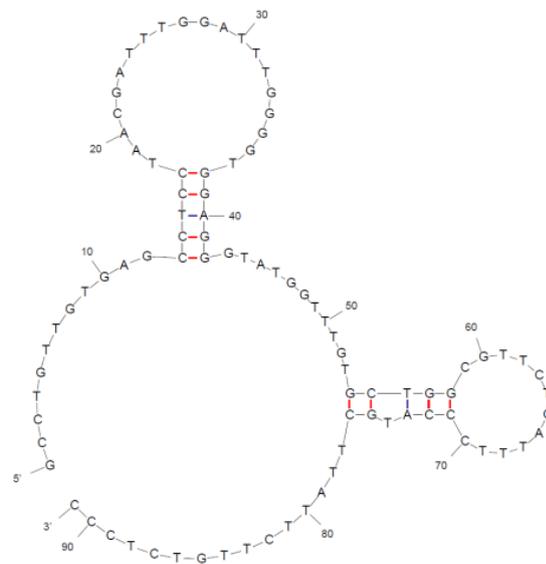
SDA2-M1 wurde mittels FRA auf Selektin-Bindung getestet. Es wurde keine Affinität zwischen SDA2-M1 und rhE- bzw. rhP-Selektin festgestellt. Die hier beschriebene Verkürzung von SDA2 führte zum Verlust der Selektin-Bindung.

SDA2:

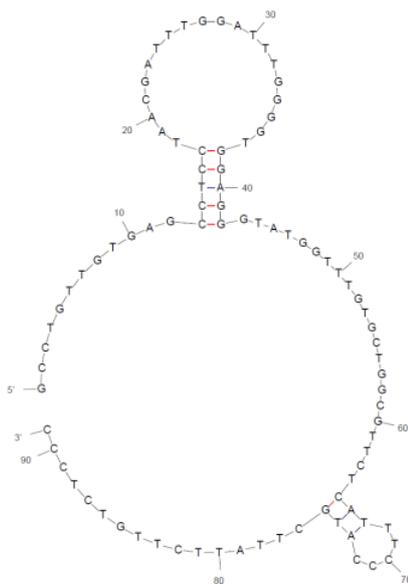
GCCTGTTGTGAGCCTCCTAACGATTTGGATTGGGGTGGAGGGTATGGTTTGTGCTGGCGTTCTCATTTCCCATGCTTATCTTGTCTCCC



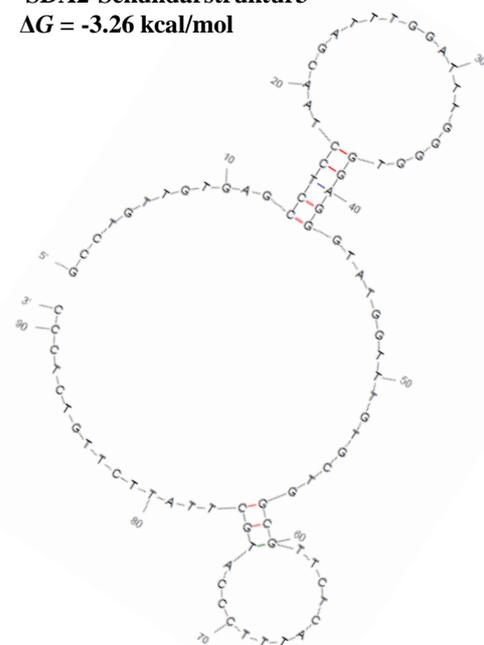
SDA2-Sekundärstruktur1
 $\Delta G = -3.85$ kcal/mol



SDA2-Sekundärstruktur3
 $\Delta G = -3.26$ kcal/mol



SDA2-Sekundärstruktur2
 $\Delta G = -3.36$ kcal/mol



SDA2-Sekundärstruktur4
 $\Delta G = -2.91$ kcal/mol

Abbildung 35: Mfold Sekundärstrukturvorhersage für SDA2. Dargestellt sind vier vorgeschlagene Strukturen des DNA-Aptamers SDA2 mit ihren entsprechenden minimalen freien Faltungsenergien (ΔG).

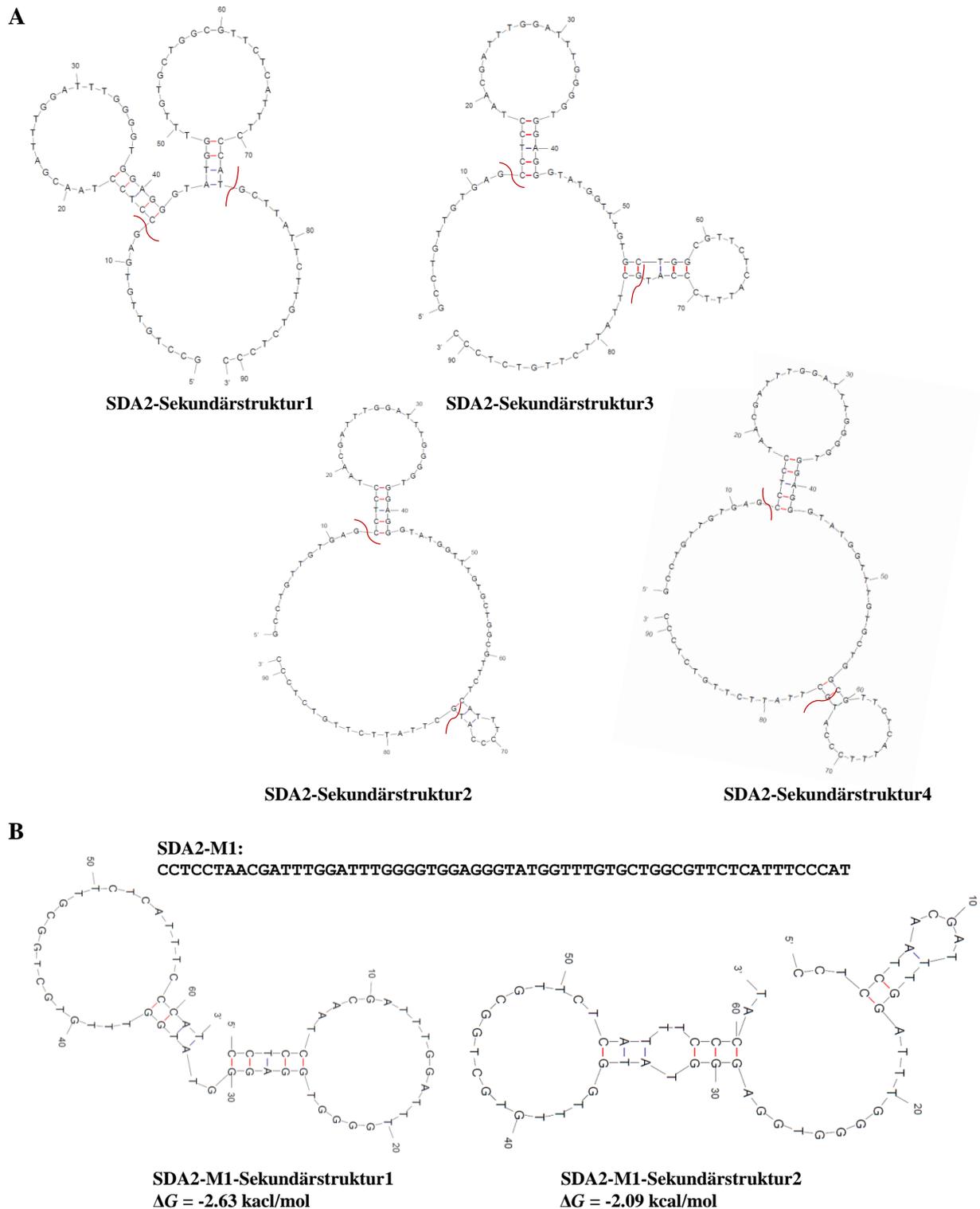


Abbildung 36: Mfold Sekundärstrukturvorhersage für SDA2 und SDA2-M1. (A) Dargestellt sind die vier vom Programm vorgeschlagenen Strukturen des DNA-Aptamers SDA2; die rot markierten Schnittstellen begrenzen das verkürzte SDA2-M1-Molekül. (B) Zwei vorgeschlagenen Sekundärstrukturen für SDA2-M1 mit ihren entsprechenden minimalen freien Faltungsenergien (ΔG).

4.3.3.3 ANALYSE DER APTAMERFALTUNG MITTELS ZIRKULARDICHROISMUS

Der Faltungszustand der selektierten Aptamere SDA1 und SDA2 wurde mittels Zirkulardichroismus (CD) untersucht (3.5.3). Die im CD-Spektrum resultierenden Minima und Maxima aus der Auftragung der Elliptizität gegen die Wellenlänge erlauben eine zusätzliche Aussage über die Sekundärstruktur von Proteinen und Oligonucleotiden. Die erhaltenen Graphen für SDA1 und SDA2 zeigen das typische Verhalten von Oligonucleotiden, die eine B-Form aufweisen (Abbildung 37 A, B).

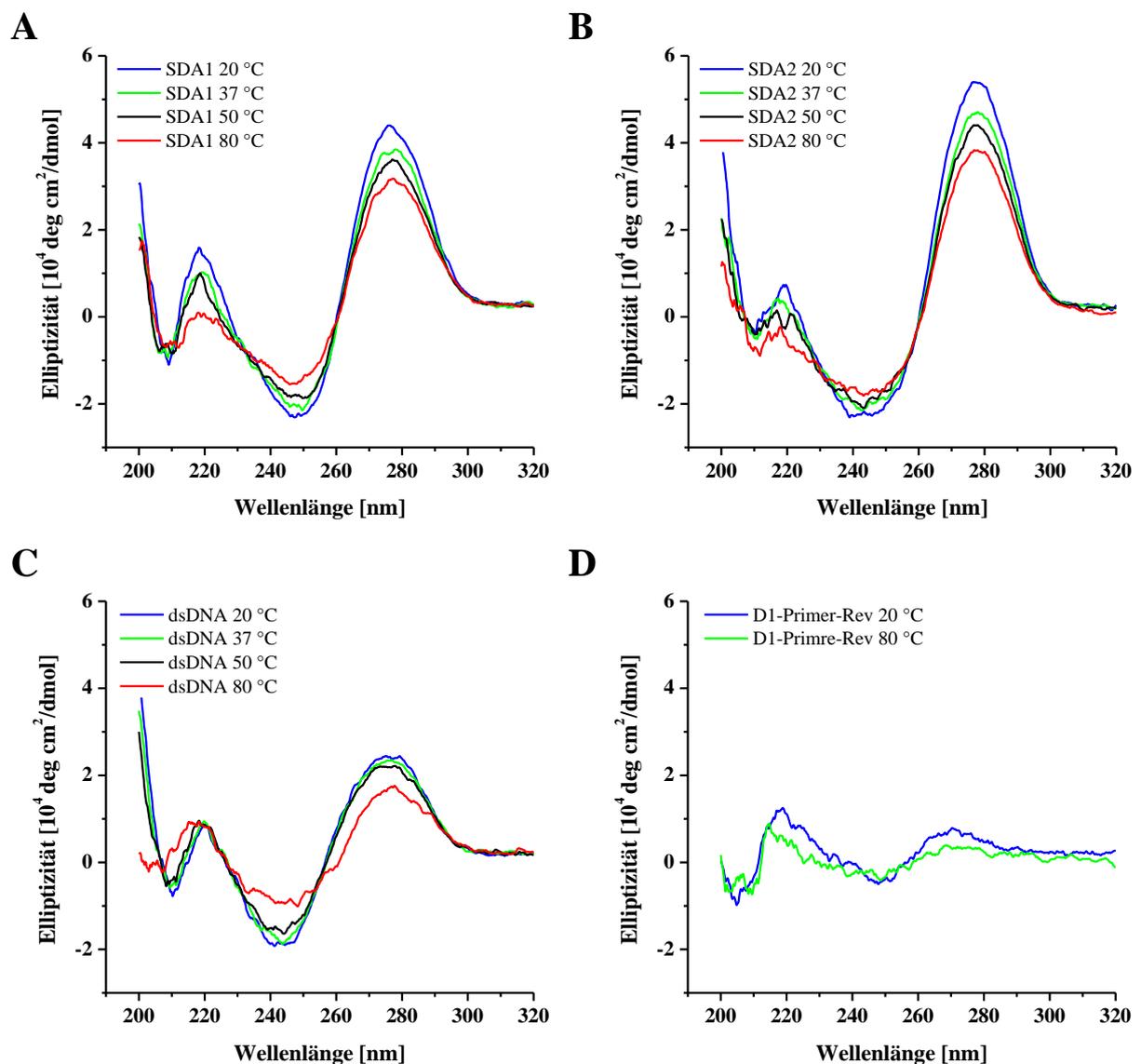


Abbildung 37: CD-spektroskopische Sekundärstrukturanalyse der DNA-Aptamere SDA1 und SDA2. (A) SDA1 und (B) SDA2 zeigen lokale Maxima bei 220 nm und bei 280 nm sowie lokale Minima bei 210 nm und bei 245 nm, die für eine B-Form charakteristisch sind. Eine dsDNA als positiv- und der D1-Primer-Rev als negativ-Kontrolle wurden ebenfalls analysiert (C, D).

In einem Temperaturbereich von 20 - 80 °C bei einer Wellenlänge von 210 bzw. 245 nm besitzt SDA1 Elliptizitäten von -1 bis -0.8 bzw. -2.8 bis -1.2 x 10⁴ deg cm²/dmol. Bei 220 und 280 nm wurden positive Elliptizitäten von 1.6 - 0.2 und 4.4 -3.2 x 10⁴ deg cm²/dmol für SDA1 detektiert (Abbildung 37 A). Für SDA2 wurden bei 210 und 245 nm im Temperaturbereich von 20 - 80 °C negative Elliptizitäten von 0.2 - 0.5 und 2.2 - 1.8 deg cm²/dmol detektiert. Bei 220 und 280 nm wurden Elliptizitäten von +0.8 bis -0.8 und +5.2 bis +3.8 deg cm²/dmol gemessen (Abbildung 37 B). Die temperaturabhängige Verschiebung der Minima und Maxima Richtung Null veranschaulicht die strukturelle Veränderung bzw. das Aufbrechen der für die B-Form verantwortlichen Doppelstrang-Regionen. Der unterschiedliche Kurvenverlauf bei 20 bzw. 37 °C (Abbildung 37 A, B) weist darauf hin, dass beide Aptamere unterhalb der biologisch relevanten Temperatur von 37 °C eine Struktur ausbilden, die sich schon bei 37 °C verändert. Bei höheren Temperaturen nehmen das Minimum bzw. Maximum im nahen UV-Bereich (ca. 245 – 280 nm, Abbildung 37 A, B) langsam in Höhe bzw. Tiefe ab. Die Entstehung und Veränderung diese Signale ist auf die Wendungswinkel bzw. Dipol-Orientierung des Moleküles zurückzuführen. Das Minimum bzw. Maximum in Fern-UV (ca. 205 - 220 nm, Abbildung 37 A, B), welches über die Sekundärstruktur des Moleküls Informationen erteilt, löst sich wiederum bei höheren Temperaturen fast auf.

So wie die Kontroll-DNA, welche ebenfalls den entsprechenden B-DNA-Kurvenverlauf zeigt (Abbildung 37 C), weisen beide Aptamere auch bei 80 °C ein kleines Minimum bei 210 nm auf. Dies deutet auf das Vorhandensein von einer minimalen Sekundärstruktur bei 80 °C hin während bei der Kontroll-DNA eine vollständige Denaturierung des Doppelstrangs zu beobachten ist. Bei Temperaturen von 20 - 80 °C und Wellenlängen von 210 bzw. 245 nm wurden für die Kontroll-DNA Elliptizitäten von -0.8 bis 0 und -1.8 bis -1 x 10⁴ deg cm²/dmol detektiert. Bei 220 nm wurde eine Elliptizität von 1 gemessen, deren lokales Maximum sich bei 80 °C zu 218 nm hin verschob. Bei 280 nm zeigte die Kontroll-DNA bei 20 - 50 °C ähnlichen Elliptizitäten von ca. 2.4 welche sich bei einer Temperatur von 80 °C auf 1.8 x 10⁴ deg cm²/dmol verkleinerte. Das ebenfalls zur Kontrolle aufgenommene CD-Spektrum des 20 nt langen Primers D1-Primer-Rev zeigte den Kurvenverlauf nicht gefalteter DNA, der auf Grund des $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs nur bei 220 nm Elliptizitäten im Bereich 1 x 10⁴ deg cm²/dmol aufwies (Abbildung 37 D).

4.3.4 NACHWEIS DER APTAMER-STABILITÄT

4.3.4.1 CHARAKTERISIERUNG DER APTAMER-STABILITÄT MITTELS SCHMELZKURVENANALYSE

Mit Hilfe der UV-Spektroskopie wurde die Schmelztemperatur (T_m) der selektierten Aptamere ermittelt (3.5.4).

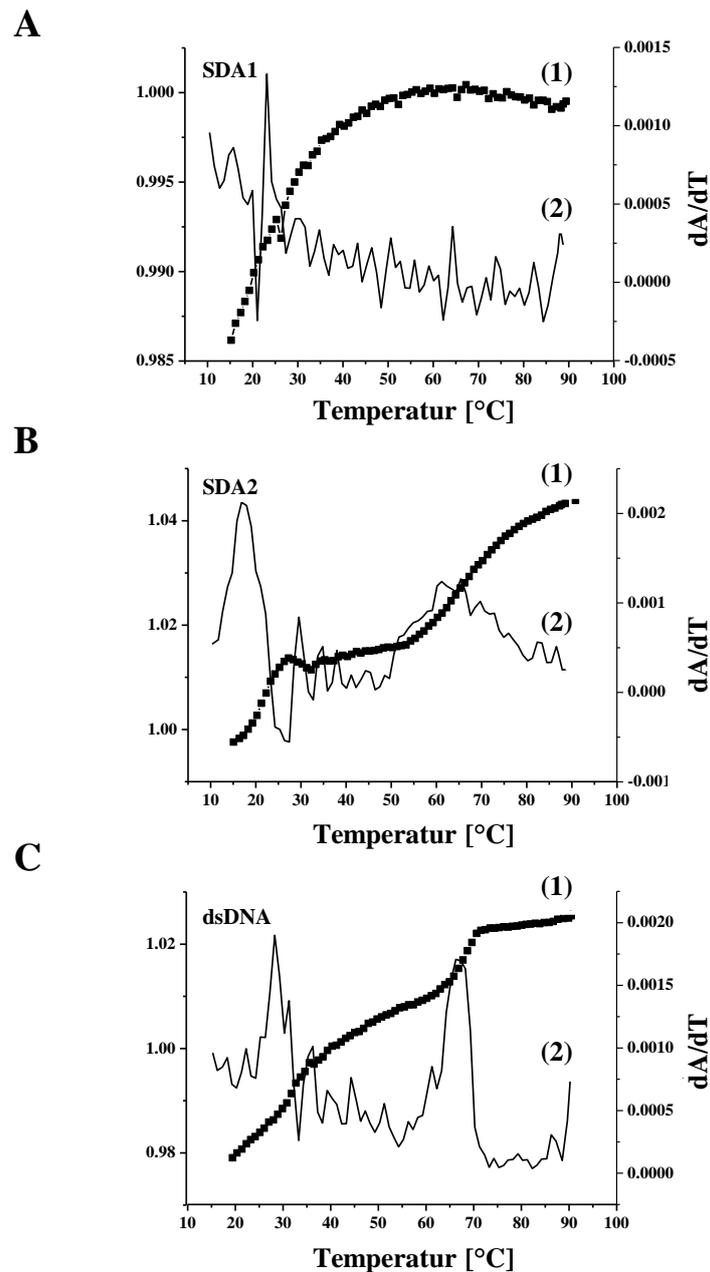


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Schmelzkurven für SDA1 und SDA2 in Integral- (1) bzw. Differentialform (2). Gemessen wurde das Absorptionsverhalten der Aptamere bei 260 nm und steigender Temperatur. Für SDA1 (A) konnte keine Schmelztemperatur ermittelt werden. Für SDA2 (B) wurde eine Schmelztemperatur von ca. 70 °C errechnet. Für die dsDNA (C) wurde eine Schmelztemperatur von 65 °C bestimmt.

Hierfür wurde bei zunehmender Temperatur das Absorptionsverhalten der Nucleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Abbildung 38). Dabei wurden die Schmelzkurven sowohl als Intergral- (1) als auch als Differentialkurve (2) gezeigt. Somit wird die Schmelztemperatur aus dem Wendepunkt der Intergralkurve welches das Maximum der Differentialkurve entspricht wiedergegeben. Während für SDA1 mittels UV-Spektroskopie kein T_m -Wert ermittelt werden konnte (Abbildung 38 A), ergaben sich für SDA2 zwei T_m -Werte. Dies weist auf ein Bi-Phasen-System hin (Abbildung 38 B). Unter physiologischen Aspekten ist ein T_m -Wert unterhalb von 37 °C nicht relevant, so dass der erste T_m -Wert für SDA2, welcher unterhalb von 37 °C ist, nicht ermittelt wurde. Für SDA2 wurde ein T_m -Wert von ca. 70 °C ermittelt. Für die als Kontrolle mit untersuchte 60 bp lange dsDNA ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für SDA2. Für dsDNA wurde ein T_m -Wert von 65 °C ermittelt (Abbildung 38 C).

4.3.5 CHARAKTERISIERUNG DER SERUMSTABILITÄT DER RHE-SELEKTIN-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMERE

Für zellbiologische Untersuchungen sowie für eine spätere biologische Anwendung der selektierten Aptamere wird für diese eine gewisse Stabilität in Serum vorausgesetzt. Dies wurde mittels Nuclease-Stabilitäts-Assay überprüft (3.5.5). Dabei wurde die Verweildauer von radioaktiv markierten Oligonucleotiden im Vollmedium verfolgt und ausgewertet. Wie Abbildung 39 zeigt, liegen nach einer Stunde Inkubationszeit im Vollmedium noch mehr als die Hälfte beider Aptamere (SDA1: $54 \pm 5\%$, SDA2: $75 \pm 11\%$) im Vollängen-Zustand vor. Es wurde innerhalb von zwölf Stunden ein allmählicher Abbau der Aptamere beobachtet. Nach vier Stunden konnten noch $22 \pm 11\%$ SDA1 und $40 \pm 4\%$ SDA2 und nach sechs Stunden $18 \pm 7\%$ SDA1 und $38 \pm 8\%$ SDA2 im Vollängen-Zustand nachgewiesen werden. Nach ca. sieben Stunden war eine Stagnation feststellbar, sodass nach zwölf Stunden Inkubation noch ca. 20% Vollängen-DNA vorhanden waren (SDA1: $15 \pm 7\%$, SDA2: 27 ± 8). Ein Vergleich zwischen den beiden Aptameren zeigte eine minimal höhere Stabilität von SDA2 im Vergleich zu SDA1, was an einer unterschiedlichen Faltung beider Aptamere und damit ihrer Zugänglichkeit für die entsprechenden Nucleasen liegen kann.

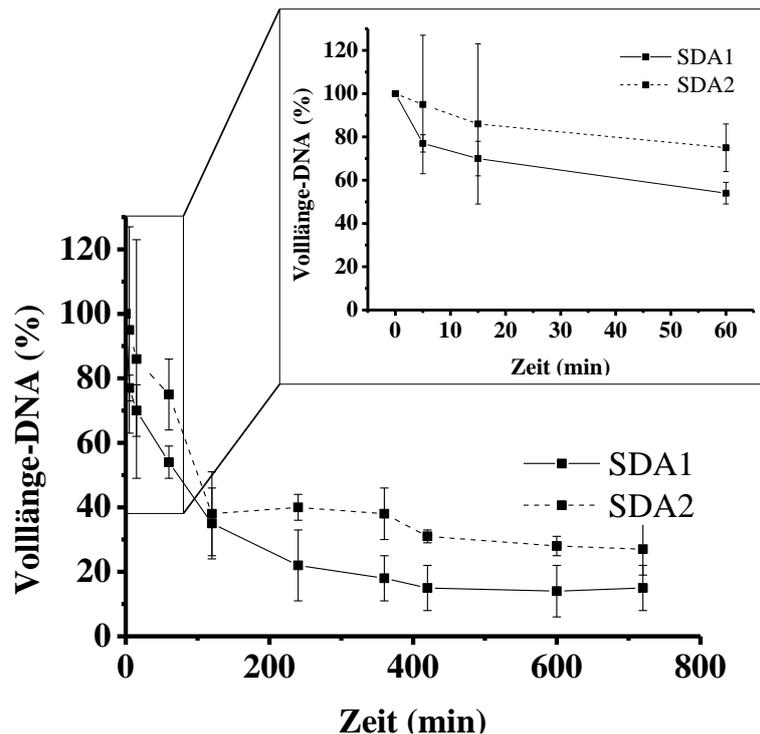


Abbildung 39: Auswertung der Nuclease-Resistenz von SDA1 und SDA2 in Vollmedium. Darstellung der mittels nativer PAGE ermittelten Stabilität beider Aptamere in Vollmedium mit Standardabweichungen. Die radioaktiv markierten Aptamere wurden für definierte Zeiträume bei 37 °C in Vollmedium inkubiert, in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und anschließend mittels nativer PAGE analysiert. n = 2

Die somit ermittelte relative Stabilität der selektierten Aptamere SDA1 und SDA2 unter *in vitro*-Kulturbedingungen erlaubte ihren Einsatz für die anschließende Überprüfung der Aptamer-Protein-Interaktion mittels geeigneter Zellkulturen.

4.4 UNTERSUCHUNG DER APTAMER-PROTEIN-INTERAKTION

4.4.1 EINFLUSS DER DNA-APTAMERE AUF DIE INTERAKTION VON SELEKTIN UND SELEKTIN-LIGAND-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

Mittels Durchflusszytometrie kann die Interaktion zwischen Zellen und fluoreszenzmarkierten Molekülen verfolgt werden. Das ermöglicht die Analyse der Bindung zwischen den mit Phycoerythrin (PE)-fluoreszenzmarkierten Selektinen und den Selektin-Ligand-präsentierenden HT29-Zellen (3.6.1). Außerdem kann die Inhibition dieser Interaktion in Anwesenheit von SDA1 sowie SDA2 untersucht werden. Bei Prä-Inkubation von PE-fluoreszenzmarkierten rhE-Selektin mit einer 2 µM SDA1-Lösung konnte eine signifikante Inhibition $15 \pm 2.6\%$ ($P < 0.01$) der Interaktion zwischen rhE-Selektin und HT29-Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden. Diese nahm bei einer SDA1-Konzentration

von 5 μM auf $22.50 \pm 7.8\%$ ($P < 0.05$) zu und zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt über den gewählten Konzentrationsbereich (Abbildung 40 A).

Ein stärkerer inhibitorischer Effekt war bei der Interaktion zwischen rhP-Selektin mit HT29-Zellen in Anwesenheit von SDA1 zu beobachten (Abbildung 40 C). Hierbei wurde bei einer Aptamer-Konzentration von 1 μM ein signifikanter Rückgang der Bindung zwischen HT29- und PE-fluoreszenzmarkierten rhP-Selektin um $61.00 \pm 1.4\%$ ($P < 0.001$) und bei einer Aptamer-Konzentration von 5 μM um $72.50 \pm 16.3\%$ ($P < 0.05$) beobachtet. SDA2 zeigte bei einer Konzentration von 0.2 μM einen inhibitorischen Effekt auf die rhP-Selektin/Selektin-Ligand-Interaktion von $36.83 \pm 9.6\%$ (Abbildung 40 C). Die SDA2 bedingte Inhibition nahm bei einer Konzentration von 5 μM auf $76.98 \pm 6.1\%$ ($P < 0.001$) zu, so dass SDA2 auf rhP-Selektin einen ähnlichen inhibitorischen Effekt wie SDA1 ausübte. Eine SDA2-bedingte Inhibition der rhESelektin-HT29-Interaktion konnte nicht reproduziert werden.

Die Untersuchungen mit einer als Kontrolle dienenden einzelsträngigen DNA, welche identische Primer-Sequenzen aufwies, dienten als Nachweis des inhibitorischen Potenzials der Aptamere. Bei einer Konzentration von 2, 3 bzw. 5 μM zeigte die Kontroll-DNA eine nicht signifikante Inhibition von rhE-Selektin von 4, 5 und 1% (Abbildung 40 A). Bei denselben Konzentrationen wurde eine zum Teil signifikant niedrigere Inhibition der Bindung von rhP-Selektin von $21.00 \pm 5.0\%$ ($P < 0.001$), $24.50 \pm 9.2\%$ ($P < 0.01$) und 16.00 ± 14.7 beobachtet (Abbildung 40 C).

Die Anwesenheit eines fünffach höher konzentrierten Kompetitors hatte keinen Einfluss auf die mittels Aptamer verursachte Inhibition (Abbildung 40 B, D). Während SDA1 bei einer Konzentration von 5 μM die Interaktion zwischen rhE-Selektin und HT29-Zellen zu $22.50 \pm 7.8\%$ ($P < 0.05$) inhibierte, verändert sich dieser Wert kaum in Anwesenheit von 25 μM Kompetitor (23.50 ± 4.9 ; $P < 0.05$, Abbildung 40 B). Auch die mittels 5 μM SDA1 verursachte Inhibition der Bindung zwischen rhP-Selektin und HT29-Zellen von $74.00 \pm 11.7\%$ ($P < 0.01$) veränderte sich nur minimal in Anwesenheit von 25 μM Kompetitor auf $78.00 \pm 7.8\%$ ($P < 0.01$, Abbildung 40 D). Der Kompetitor alleine bewirkte bei einer Konzentration von 25 μM einen nicht signifikanten Einfluss von $12.01 \pm 15.1\%$. SDA2 (5 μM) inhibierte die Interaktion zwischen rhP-Selektin und HT29-Zellen zu $77.00 \pm 6.8\%$ ($P < 0.01$). In Anwesenheit von 25 μM Kompetitor veränderte sich diesen Wert kaum ($78.00 \pm 4.0\%$; $P < 0.01$). Für den Kompetitor alleine wurde bei einer Konzentration

von 25 μM eine unspezifische Effekt auf die Bindung von rhP-Selektin und HT29-Zellen von $12.00 \pm 15.1\%$ beobachtet (Abbildung 40 D).

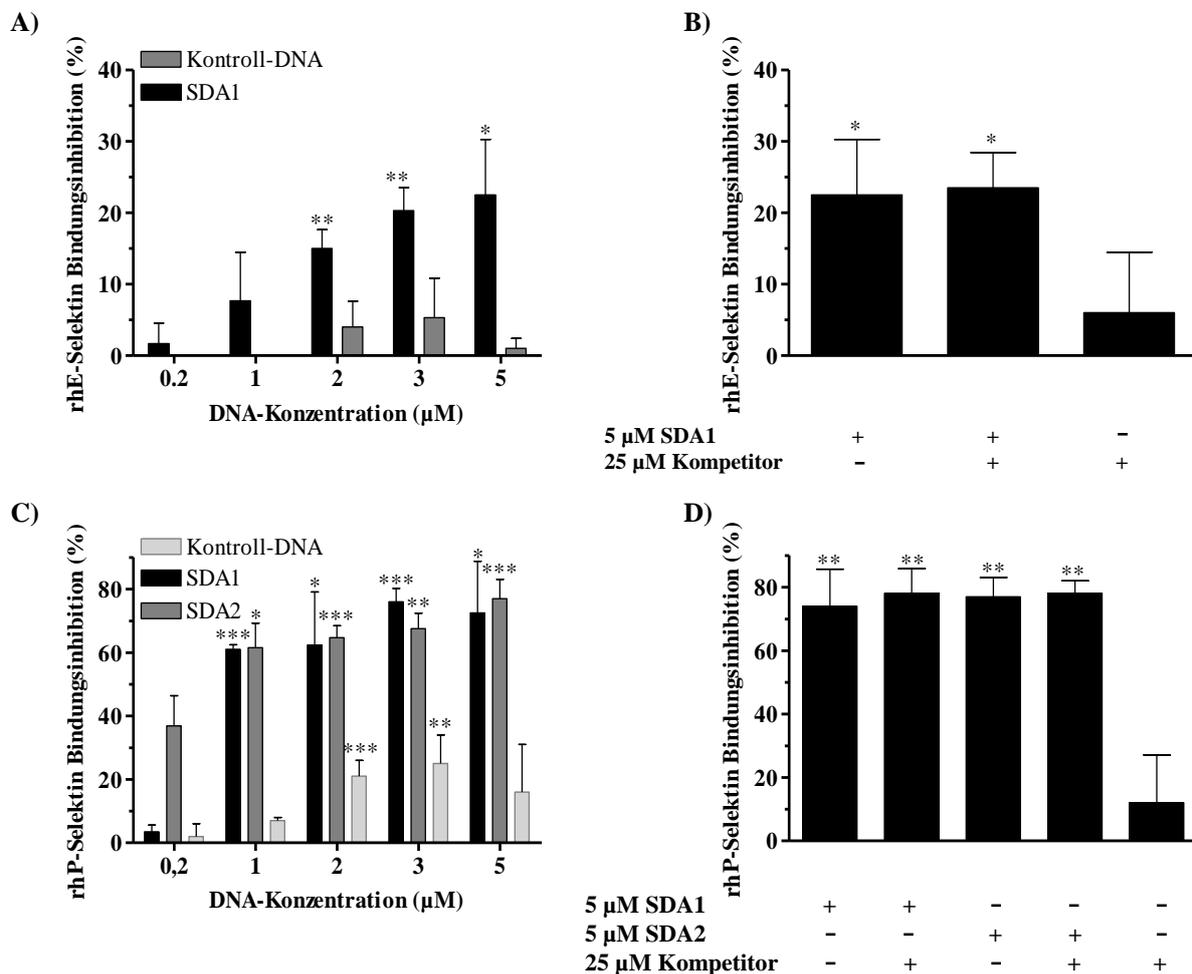


Abbildung 40: Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Bindungsinhibition von rhE- bzw. rhP-Selektin und HT29-Zellen mittels SDA1 bzw. SDA2 in einem statischen System. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Inhibition der Bindung zwischen den Selektinen und den Selektin-Ligand-präsentierenden HT29-Zellen mittels Aptamere mit Standardabweichung. Abhängig von der Aptamer-Konzentration (0.2 – 5 μM) nimmt die Inhibition der Bindung zwischen rhE-Selektin (A) bzw. rhP-Selektin (C) und HT29-Zellen zu. Die Anwesenheit von fünffachem Überschuss an Kompetitor zeigt keinen Einfluss auf Aptamer-vermittelte Inhibition (B, D). Die gezeigten Daten basieren auf drei unabhängigen Experimenten. Bei der Berechnung des *P*-Werts wurde das Ergebnis aus der nicht mit Aptameren prä-inkubierte Selektin-Kapillare als Standard eingesetzt.

In einem nächsten Schritt sollte durch einen laminaren *Flow-Assay* die Beständigkeit der Bindung zwischen Selektinen und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen in Anwesenheit der selektierten Aptamere unter physiologischen Scher-Bedingungen untersucht werden (3.6.2.1). Dafür wurden die für die Adhäsion von sLe^X- bzw. sLe^A-präsentierenden Zellen verantwortlichen rhE- bzw. rhP-Selektine auf der Oberfläche von Kapillaren (*IBIDI* *treat microslides VI*) immobilisiert und mit SDA1 bzw. SDA2 inkubiert. Durch anschließende Simulation eines laminaren Flusses der entsprechenden Zellen (Flussrate = 8 mL/h) und der

mikroskopischen Detektion ihrer Adhäsion wurde das Potential der Aptamere zur Störung der Selektin-Zell-Interaktion quantifiziert.

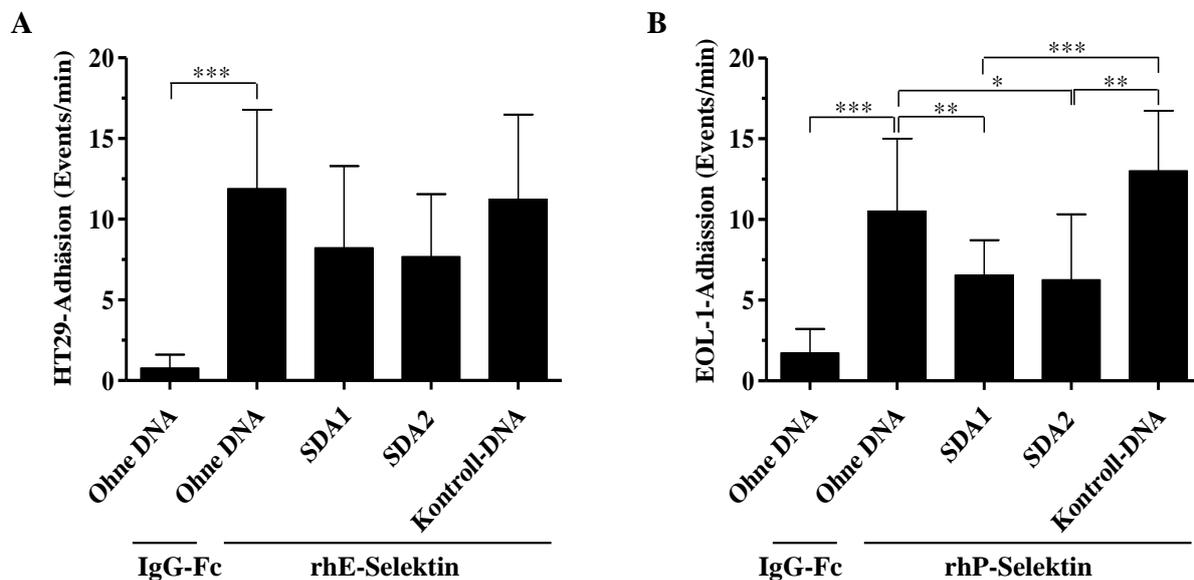


Abbildung 41: Inhibition der Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen in einem dynamischen System. Dargestellt ist die Anzahl der Adhäsionen von Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen an der immobilisierten Kapillaroberfläche pro Minute unter laminaren Flussbedingungen; mit Standardabweichungen. Die immobilisierten rhE- (A) bzw. rhP- (B) Selektin/IgG-Fc-Chimären (0.2 μ M) wurden mit 5 μ M des entsprechenden Aptamers prä-inkubiert. Selektin-Ligand-präsentierende HT29- (A) bzw. EOL-1- (B) Zellen wurden mit einer Flussrate von 8 mL/h über die immobilisierten Selektine geleitet und deren Adhäsion mikroskopisch in Echtzeit verfolgt. Es wurde nur wenig HT29- bzw. EOL-1-Adhäsion auf dem IgG-Fc verzeichnet. Beide Aptamere reduzierten die HT29-Adhäsion (n = 6 aus zwei unabhängigen Experimenten).

Wie in Abbildung 41 A dargestellt, wurde nur in den mit rhE-Selektin behandelten Kapillaren eine rhE-Selektin bedingte Adhäsion von HT29-Zellen beobachtet (11.89 ± 4.91 Events/min, $P < 0.001$ quantifiziert auf IgG-Fc). Eine deutliche Reduzierung dieser Adhäsion wurde in den Kapillaren beobachtet, in denen rhE-Selektin immobilisiert und mit den Aptameren prä-inkubiert worden war. Sowohl SDA1 als auch SDA2 führten dabei zu einer Reduzierung der Interaktion zwischen HT29-Zellen und rhE-Selektin von etwa 30% bzw. 35% (SDA1; 8.22 ± 5.07 Events/min, SDA2; 7.67 ± 3.88 Events/min). Kontroll-DNA zeigte keine nachweisbare Inhibition (11.22 ± 5.27 Events/min), so dass die Reduzierung der HT29-Adhäsion durch den Einsatz der Aptamere als spezifisch betrachtet werden kann. Die ebenfalls durchgeführte Kontrolle mit IgG-Fc veranschaulichte, dass die Zelladhäsion über die Selektine und nicht über den an die Selektine fusionierten IgG-Fc-Teil stattfand (0.78 ± 0.83 Events/min). In Abbildung 41 B ist die Adhäsion von EOL-1 Zellen auf den mit rhP-Selektin beschichteten Kapillaren unter Einfluss der Aptamere dargestellt. In der mit rhP-Selektin-beschichteten Kapillare adhärten 10.42 ± 3.73 ($P < 0.01$ quantifiziert auf IgG-Fc) EOL-1-Zellen pro Minute. In den rhP-Selektin-beschichteten Kapillaren, die mit SDA1 bzw.

SDA2 prä-inkubiert worden waren, wurde ein signifikanter Rückgang der Zelladhäsion von 37% bzw. 40% beobachtet (SDA1: 6.54 ± 2.18 Events/min; $P < 0.01$ quantifiziert auf rhE-Selektin ohne DNA bzw. $P < 0.001$ quantifiziert auf rhE-Selektin mit Kontroll-DNA, SDA2: 6.25 ± 4.07 Events/min; $P < 0.05$ quantifiziert auf rhE-Selektin ohne DNA bzw. $P < 0.01$ quantifiziert auf rhE-Selektin mit Kontroll-DNA). Die rhP-Selektin-Vorbehandlung mit Kontroll-DNA führte auch hier zu keiner Veränderung des Adhäsionsverhalten der Zellen (13.00 ± 3.74 Events/min). Ebenfalls zeigte die mit IgG-Fc beschichtete Kapillare (1.73 ± 1.5 Events/min; $P < 0.001$ quantifiziert auf rhE-Selektin ohne DNA), dass keine Adhäsion allein durch den IgG-Fc-Teil hervorgerufen wurde und somit die rhP-Selektine für die Zelladhäsion verantwortlich waren.

4.4.2 EINFLUSS DER DNA-APTAMERE AUF DIE INTERAKTION VON SELEKTIN-PRÄSENTIERENDEN UND SELEKTIN-LIGAND-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

Nachdem die Aptamer-Selektin-Interaktion unter Scher-Bedingungen eine Inhibition der Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen zeigte, wurde in einem zweiten Laminaren-Fluss-Assay der Einfluss der Aptamere auf die Zell-Zell-Interaktion untersucht (3.6.2.2). Dabei wurde die Interaktion zwischen E-Selektin-präsentierenden HPMECs und HT29-Zellen in An- und Abwesenheit von SDA1 und SDA2 unter simulierten physiologischen Bedingungen untersucht.

Abbildung 42 zeigt die quantifizierte HT29-Adhäsion unter verschiedenen Bedingungen. Durch Stimulation der HPMEC-Zellen mit TNF- α -präsentierten die HPMECs E-Selektin auf der Oberfläche. Die Anwesenheit von E-Selektin erhöhte die HT29-HPMEC-Interaktion von 1.50 ± 1.29 (nicht stimulierte HPMECs) auf 23.17 ± 12.67 ($P < 0.001$ quantifiziert auf nicht-stimulierte HPMECs) Adhäsionen pro Minute signifikant. Eine Prä-Inkubation der TNF- α -stimulierten HPMECs mit SDA1 bzw. SDA2 reduzierte dagegen diese Interaktion um 38% (14.33 ± 2.25 Events/min) bzw. um 54% (10.50 ± 2.07 Events/min, $P < 0.05$ quantifiziert auf stimulierte HPMECs ohne DNA bzw. mit Kontroll-DNA), während kein Rückgang der Zelladhäsion in dem mit Kontroll-DNA prä-inkubierten Kanal zu verzeichnen war. Der signifikante Unterschied zwischen der HT29-Adhäsion auf stimulierten HPMECs in Anwesenheit von SDA2 bzw. Kontroll-DNA belegt, dass mittels SDA2 die Interaktion zwischen E-Selektin und seinen Liganden spezifisch inhibiert wurde.

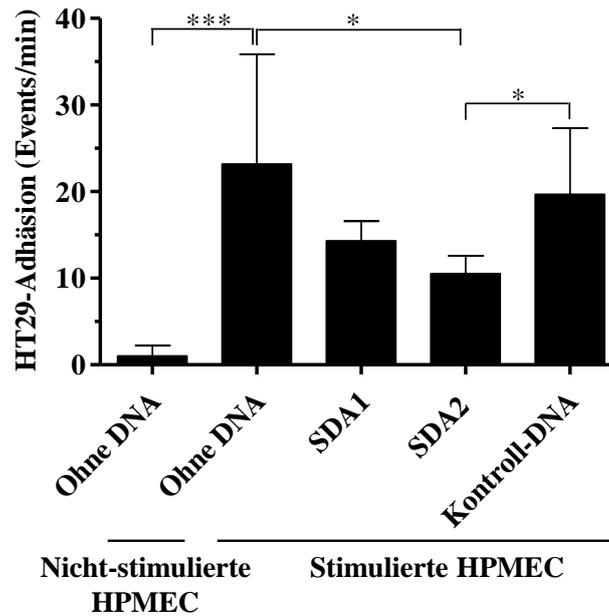


Abbildung 42: Inhibition der Interaktion zwischen Selektin- und Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen in einem dynamischen System. Dargestellt ist die Anzahl der Adhäsionen von Selektin-Ligand-präsentierenden HT29-Zellen an der immobilisierten Kapillaroberfläche pro Minute unter laminaren Flussbedingungen mit Standardabweichungen. Die immobilisierten und mit TNF- α -stimulierten HPMECs wurden mit einer 5 μ M SDA1 bzw. SDA2 Lösung prä-inkubiert. Selektin-Ligand-präsentierende HT29-Zellen wurden mit einer Flussrate von 8 mL/h über die immobilisierten HPMECs geleitet und deren Adhäsion auf den HPMECs mikroskopisch in Echtzeit verfolgt. Es wurde keine HT29-Adhäsion durch nicht stimulierte HPMECs vermittelt. Beide Apamere reduzieren die HT29-Adhäsion um 38% bzw. 54% (n = 6 aus zwei unabhängigen Experimenten). Für die Bestimmung des P-Werts wurde die mit TNF- α -stimulierte, HPMEC-Kapillare ohne DNA als Standard gesetzt.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Selektion und Charakterisierung rhE-Selektin-spezifischer DNA-Aptamere zur Inhibition der Interaktion zwischen rhE-Selektin und dessen Liganden. Zukünftig soll so ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt gegen den initialen Schritt der Metastasierung, die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen, realisiert werden. Hierzu wurden DNA-Aptamere mittels der SELEX-Methode selektiert. Nach der Klonierung wurden aus der rhE-Selektin-affinen DNA-Bibliothek Sequenzen ermittelt. Das führte zur Identifizierung des Selektin-DNA-Aptamers 1 (SDA1) und des Selektin-DNA-Aptamers 2 (SDA2). Beide Aptamer binden an humanes rekombinantes E- als auch P-Selektin und sind in der Lage, die Interaktion zwischen diesen und dem endothelialen E-Selektin und Tumorzellen zu inhibieren.

5.1 DIE ROLLE DER SELEKTINE IM METASTASIERUNGSPROZESS UND MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE

Mit dem Begriff Krebs wird eine bösartige Neoplasie von Gewebe, der Tumor, zum Ausdruck gebracht, dessen Streuung im Körper meistens mit dem Tod der betroffenen Patienten endet. Weltweit sterben jährlich Tausende von Menschen an den Folgen ihrer Krebserkrankung.⁸⁶ Die Ursache für die hohe Sterblichkeit ist dabei nicht immer der Tumor an sich, sondern vielmehr dessen Metastasierung.⁸⁷ Deshalb stellt deren Bekämpfung noch immer eine große Hürde in der Krebstherapie dar.⁸⁸ Um unkontrollierte Streuung von Metastasen im Körper zu verhindern, muss die Transmigration der zirkulierenden Tumorzellen unterbunden werden.⁸⁹

Eine Vielzahl von Studien belegen, dass E- und P-Selektine unter anderem für die Transmigration der Tumorzellen mitverantwortlich sind.^{56,59,60} Mitglieder der Selektin-Familie befinden sich auf der Plasmamembran. Es sind Calcium-abhängige Glykoproteine, die als Zelladhäsionsmoleküle fungieren, und Zellen, die einen entsprechenden Liganden tragen, dazu verhelfen, auf Plasmamembranen zu adhären, um anschließend transmigrieren

zu können.⁹⁰ Dabei imitieren die Tumorzellen Leukozyten und binden mit ihren sLe^X- und sLe^A-modifizierten Sialomucinen an den von den Endothelzellen präsentierten E- und P-Selektinen. Diese Interaktion verhilft den Tumorzellen dazu, auf den Endothelzellen zu rollen, um anschließend aus der Blutbahn zu extravasieren und in den Geweben unterhalb des Endotheliums zu kolonisieren.

Aus diesem Grund wird den Selektinen bei der Bekämpfung von Metastasierung eine Schlüsselrolle zugeordnet. Selektine stellen somit ein interessantes Target in der medizinischen Forschung dar. Die Unterdrückung der Selektin-Produktion⁶¹ und die Inhibition der Wechselwirkung mit ihren Zielmolekülen sind dabei mögliche therapeutische Ansatzpunkte.⁷⁰ 1993 berichteten Nelson *et al.*,⁹¹ dass das Polysaccharid Heparin möglicherweise P- und L-Selektin inhibiert, dessen breites Wirkungsspektrum jedoch eventuell für die Krebs-Therapie von Nachteil ist. Deshalb wurde Heparin bisher noch nicht erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt. Im Jahr 1994 wurde über den Selektin-Antagonisten CY-1503 als möglichen E- und P-Selektin-Blockierer berichtet.⁹² Diesbezügliche Arbeiten sind mittlerweile eingestellt worden.⁹³ 2010 beschrieben Chang *et al.*⁷⁰ den hetero-bifunktionalen pan-Selektin Inhibitor GMI-1070, welcher sich derzeit noch in den klinischen Studien der Phase I befindet. Auch Antikörper können zur Inhibition der Interaktion zwischen Molekülen eingesetzt werden. So wurde im Jahr 2000 der Anti-P-Selektin-Antikörper P-Sel.KO.2 und 2005 ein Anti-E-Selektin-Antikörper entwickelt.^{94,95} Neben Glycomimetica⁹³ und Antikörpern³⁹ als potentielle Selektin-Inhibitoren stellen Aptamere eine weitere Alternative zur Inhibition der Interaktion zwischen Selektin und Selektin-Liganden dar.^{39,71} Die kurzen Nucleinsäuren sind in der Lage, aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltstruktur eine hochaffine Bindung zu ihren Zielmolekülen einzugehen⁷³⁻⁷⁵ und heben sich gegenüber den Glycomimetica und Antikörpern in ihren einfachen, leicht handhabbaren und temperaturstabilen Eigenschaften hervor.⁹⁶ Im Jahr 1998 wurde über das P-Selektin-spezifische 2'-Fluoro-modifizierte RNA-Aptamer PF377 (K_d -Wert: 50 pM) berichtet,⁹⁷ wobei die Experimente in Puffer durchgeführt wurden und so der Nachweis der Stabilität des Aptamers in Serumanwesenheit nicht erbracht wurde.⁹⁸ 2010 wurde für E-Selektin das Thio-modifizierte DNA-Aptamer ESTA (K_d -Wert: 47 nM),⁹⁹ und 2011 für P-Selektin das modifizierte RNA-Aptamer ARC5690 (K_d -Wert: 15 pM) beschrieben.¹⁰⁰

Unmodifizierte RNA-Aptamere werden innerhalb von Minuten im Serum abgebaut,^{101,47} während modifizierte RNA-Moleküle über mehrere Stunden im Serum stabil sind.^{101,47} Da die

erhöhte Stabilität nur auf Kosten chemischer Modifikationen erzielt werden kann, kann dies einen limitierenden Faktor für eine spätere medizinische Anwendung darstellen. Mit dem Einsatz von DNA anstelle von RNA zur Generierung von Aptameren besteht jedoch die Möglichkeit, stabilere Aptamere zu erhalten. Wie oben schon erwähnt, existiert für E-Selektin nur ein Thio-modifiziertes DNA-Aptamer, dessen Bindung an E-Selektin durch Filter-Retentions-Assays in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Somit war das Ziel dieser Arbeit die Selektion rhE-Selektin-spezifischer unmodifizierter DNA-Aptamere.

5.2 SELEX-PROZESS ZUR ANREICHERUNG RHE-SELEKTIN-SPEZIFISCHER UNMODIFIZIERTER DNA-APTAMERE

Die durch Ellington und Szostak, Tuerk und Gold sowie Robertson und Joyce im Jahr 1990 entwickelte Methode der *in vitro* Evolution von Nucleinsäuren erlangte in der molekularbiologischen Forschung bis heute große Bedeutung. Sie ermöglicht die spezifische Selektion von Nucleinsäuren, die hochaffin und selektiv an Zielmoleküle binden. Diese als Aptamere bezeichneten Nucleinsäuren ermöglichen aufgrund der hohen Bindungsspezifität zwischen Target und selektiertem Aptamer eine sehr hohe Präzision, die dessen Anwendung unter anderem in der Medizin ermöglicht. Somit können mittels Aptameren zum Beispiel Proteine in ihren Interaktionen oder Aktivitäten spezifisch beeinflusst werden.

5.2.1 RHE-SELEKTIN-IMMOBILISIERUNG ÜBER DIE BIOTIN-STREPTAVIDIN-INTERAKTION

Die Target-Immobilisierung für den SELEX-Prozess erfolgte über eine Biotin-Streptavidin Interaktion. Dafür wurde das biotinylierte rhE-Selektin auf Streptavidin-beschichteten Dynabeads immobilisiert. Die hierfür unerlässliche Biotinylierung, welche an den Lysinresten sowie am N-Terminus erfolgt, könnte dabei eventuell zu einer ungünstigen Fixierung des Proteins auf den Dynabeads führen, was zu Beginn der Arbeit zunächst unberücksichtigt blieb. Dies hätte eine Konformationsänderung oder eine räumliche Sperrung der für die Ligandenbindung verantwortlichen C-Typ Lektin-Domäne¹³ innerhalb des E-Selektins bedeuten können.

Eine genauere Betrachtung des Aufbaus der in dieser Arbeit verwendeten rhE-Selektin/IgG-Fc-Chimäre veranschaulicht das Problem (Abbildung 43 A). Die N-terminale C-Typ Lektin-

Domäne (Abbildung 43 B, gelb unterlegt) beinhaltet zehn Lysinreste, die teilweise unmittelbar mit den für die Ligandenbindung verantwortlichen Aminosäuren Tyr48, Glu80, Asn82, Asn83, Glu92, Tyr94, Arg97, Asn105, Asp106 und Glu97 in Nachbarschaft stehen (Abbildung 43 B, fett gedruckt und unterstrichen).¹³ Während in der EGF-ähnlichen Domäne (Abbildung 43 B, lila unterlegt) keine Lysine für eine Biotinylierung vorhanden sind, beinhalten die sechs SCR-Domänen (Abbildung 43 B, grau unterlegt) insgesamt 11 Lysine, die durch eine Faktor Xa-Schnittstelle (Abbildung 43 B, grün) mit einem humanen IgG₁-Fc-Fragment (Abbildung 43 B, blau unterlegt) verbunden sind.

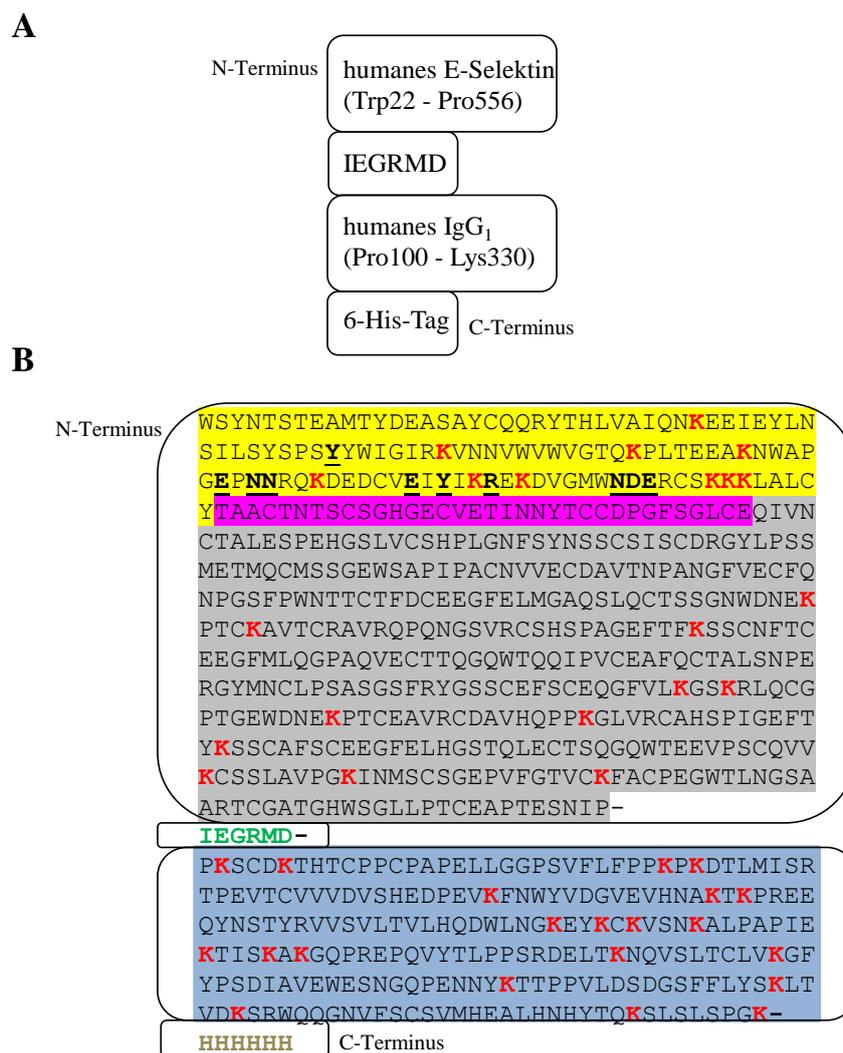


Abbildung 43: Aminosäuresequenz des rhE-Selektins. (A) Schematische Darstellung des Fusionsproteins rhE-Selektin. (B) Aminosäuresequenz des Fusionsproteins. Gelb unterlegt ist die C-Type Lektin-Domäne, lila unterlegt die EGF-ähnliche Domäne und die sechs SCR-Domänen innerhalb der extrazellulären Matrix des humanen E-Selektins sind grau dargestellt. Das humane IgG₁-Fc-Fragment ist blau unterlegt. Die Faktor Xa-Schnittstelle ist in grün und der 6-His-Tag in beige geschrieben. Die rot markierten Lysine (K) und der N-Terminus stellen potenzielle Biotinylierungsstellen dar. Die schwarz unterstrichenen Aminosäuren innerhalb der C-Typ Lektin-Domäne sind die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren.¹³ Aminosäuresequenz des humanen E-Selektins und das humane IgG₁-Fc-Fragment wurden mittels UniProt ermittelt (humanes E-Selektin UniProt-Nr.: P16581, humanes IgG₁-Fc-Fragment UniProt-Nr.: P01857).

Mit 21 Lysinen stellt das humane IgG₁-Fc-Fragment die meisten potenziellen Reaktionskomponenten für die Biotinylierung dar. C-terminal schließt sich ein His-Tag (Abbildung 43 B, beige) an. Die Lysine innerhalb des rhE-Selektins hätten durch die Biotinylierung zu einer ungünstigen Immobilisierung des Proteins auf den magnetischen Partikeln führen können. Auch eine strukturelle Veränderung des Proteins aufgrund der Immobilisierung wäre möglich gewesen. Diese hätten zu einer erfolglosen Selektion von Aptameren führen können. Für die Biotinylierung wurden das Biotin und das zu biotinylierende rhE-Selektin im Verhältnis 1:3 eingesetzt, mit der Annahme, dass dadurch nur wenige Lysinreste innerhalb des Proteins mit Biotin modifiziert werden.

Da die C-Typ Lektin-Domäne einen kleinen globulären Teil des E-Selektins darstellt (Abbildung 44), wurde angenommen, dass die sechs langgestreckten SCRs mit ihren biotinylierten Lysinresten leichter an den auf der Oberfläche der Beads verfügbaren Streptavidinen binden als die Biotin-Komponenten an den Lysinen der kleinen, globulären C-Typ Lektin-Domäne.

Die erfolgreiche Selektion der gewünschten rhE-Selektin-inhibierenden Aptamere beweist letztendlich, dass die Biotinylierung den gesamten Prozess nicht entscheidend negativ beeinflusst hat.

Abbildung 44 zeigt die Kristallstruktur des humanen E-Selektins (nur C-Typ Lektin- und EGF-ähnliche Domäne) gebunden an den Liganden sLe^X. Die zwei selektierten rhE- und rhP-Selektin-bindenden DNA-Aptamere, deren Bindung an rhE- bzw. rhP-Selektin zur Inhibition der Interaktion zwischen Selektin-Ligand-präsentierenden Zellen und den Selektinen führte, und die Tatsache, dass kein anderes Selektin-bindendes Aptamer aus der Selektion resultierte, lassen vermuten, dass möglicherweise die C-Typ Lektin-Domäne im Selektionsprozess am zugänglichsten war. Dies bedeutet, dass das rhE-Selektin so auf der Oberfläche der magnetischen Partikel immobilisiert war, dass gerade der globuläre Teil des Proteins mit dem flach auf der Oberfläche der globulären C-Typ Lektin-Domäne liegende Liganden-Bindetasche^{12,13} (Abbildung 44) nach außen gerichtet war, während der Rest des Proteins durch die Immobilisierung für die Nucleinsäuren unzugänglich wurde.

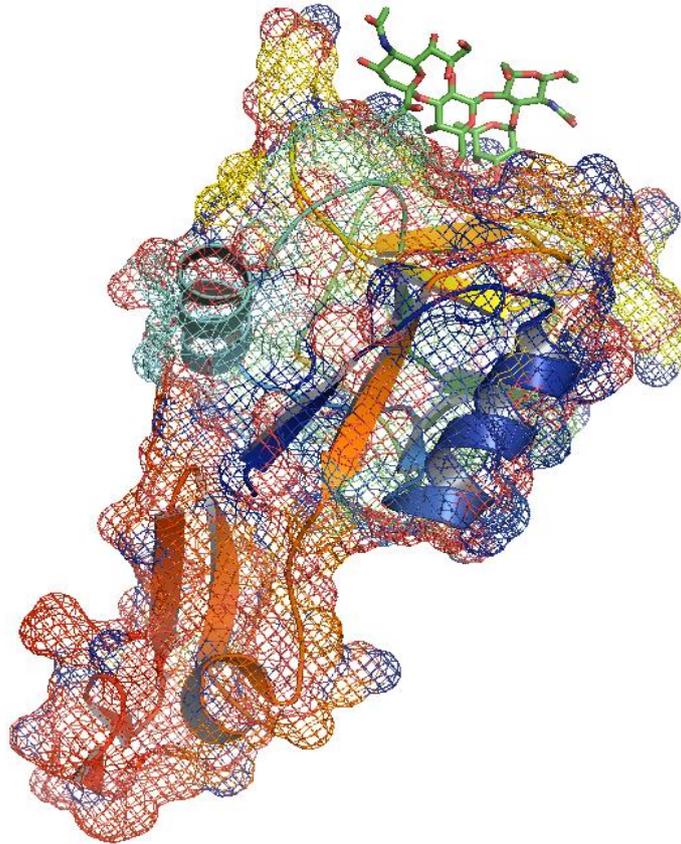


Abbildung 44: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe^X. Die Koordinaten wurden der Protein-Data-Bank (*PDB accession code*: 1G1T) entnommen. Das Netz repräsentiert die van-der-Waals-Oberfläche des im Schleifen-Format dargestellten Proteins; der Ligand ist im "Sticks"-Format dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung des E-Selektins, welches am C-Terminus ein His-Tag aufweist, wäre die Nutzung von Cobalt-beschichteten magnetischen Partikeln gewesen. Dabei findet die Protein-Fixierung über die Interaktion des His-Tags mit dem Cobalt statt, so dass die Wahrscheinlichkeit der Strukturveränderung des Proteins reduziert werden kann. Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass die Immobilisierung mittels einer schwächeren Bindung erfolgt und somit sich auch das Protein während der SELEX von den Beads ablösen könnte. Dies bringt eine Uneinheitlichkeit und somit auch eine Fehlerquelle in die Selektion mit hinein, während bei der hier verwendeten Methode das Target-Protein für die gesamte Selektion in einem Schritt präpariert wurde und in jeder Selektionsrunde identisch vorlag. Es zeigt sich in dieser Arbeit und auch in der jüngeren Literatur,^{76,77} dass die Immobilisierung von Target-Proteinen über Biotinylierung viele Vorteile beinhaltet.

5.2.2 PRÄ-SELEKTION ZUR SEPARATION UNSPEZIFISCHER DNA-MOLEKÜLE

Die Selektion von rhE-Selektin-spezifischen DNA-Aptameren erfolgte über die Inkubation einer DNA-Bibliothek mit den über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen immobilisierten rhE-Selektin beschichteten magnetischen Partikeln. Um eine Anreicherung von unspezifisch mit der Oberfläche der magnetischen Partikel wechselwirkenden DNA-Molekülen zu vermeiden, ging jeder Selektionsrunde eine Prä-Selektionsrunde voraus. Dies diente der Entfernung von Matrix-Bindern. Deshalb wurde Streptavidin bei den Bindungsstudien als Kontroll-Protein eingesetzt. Die nicht detektierbare Bindung von Aptameren an Streptavidin weist somit auf eine erfolgreiche Prä-Selektion hin.

5.2.3 ANREICHERUNG VON SELEKTIN-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMEREN

Für die *in vitro* Selektion von rhE-Selektin spezifischen DNA-Aptameren wurde wie bereits erwähnt der SELEX-Prozess angewendet.^{73,74} Alternativ dazu hätte ein SELEX-Prozess basierend auf Nitrocellulose-Membran-Filtration, Affinitäts-Chromatographie, Kapillar-Elektrophorese oder Microfluidic durchgeführt werden können.⁷⁹ Bei einem SELEX-Prozess mittels Nitrocellulose-Membran-Filtration stellt die Anreicherung von Nitrocellulose-Membran-affinen Nucleinsäuren einen Nachteil dieser Methode dar.¹⁰² Ebenfalls nachteilig ist die Target-Immobilisierung pro Selektionsrunde bei der Selektion von Aptameren mittels Kapillar-Elektrophorese, Microfluidic oder Affinitäts-Chromatographie bzw. die Regeneration des Target-Proteins nach den jeweiligen Selektionsrunden. Auch eine Selektion basierend auf *Error-prone*-PCR ist eine Methode, die in dem SELEX-Prozess integriert werden kann. Dabei handelt sich um bewusst fehlerhaft durchgeführte PCR, um eine Vielfalt von verschiedenen Sequenzen zu erreichen.¹⁰³ Das Problem bei *Error-prone*-PCR ist jedoch, dass die erwartete hohe Mutageneserate meist nicht erreicht wird.¹⁰⁴ Wegen den Nachteilen der anderen Methoden und der Tatsache, dass es sich bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode um eine standardisierte Methode handelt, erfolgte die Selektion wie beschrieben.

Bei dem SELEX-Prozess hängt die Anzahl der Selektionsrunden von den in den jeweiligen Selektionsrunden vorhandenen Aptameren ab. Deshalb kann die Menge an eingesetzten, prä-selektierten DNA-Molekülen und die Anzahl an nötigen PCR-Zyklen nach der Selektion ein Indiz auf das Vorhandensein von Aptameren liefern. Jedoch können die bei der Selektion

durchgeführten Waschschriffe, die proportional zu den Selektionsrunden gesteigert wurden, diesem entgegenwirken. Wie in Tabelle 29 aufgelistet, wurden 250 pmol DNA in der Prä-Selektionsrunde 1 eingesetzt. Die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen, lässt darauf schließen, dass nur wenige DNA-Moleküle selektiert wurden und deshalb erst nach 12 PCR-Zyklen ein Produkt gebildet wurde. Während in den Selektionsrunden 2 – 5 jeweils 20 pmol DNA in der Prä-Selektionsrunden und danach in der SELEX eingesetzt wurden, wurden die Waschschriffe mit den steigenden Selektionsrunden proportional gesteigert. Trotzdem wurde bei diesen Selektionsrunden jeweils nach zehn PCR-Zyklen ein PCR-Produkt erhalten. Dies deutet darauf hin, dass sich in der angereicherten DNA-Bibliothek DNA-Moleküle befanden, die in der Lage waren, trotz steigender Waschschriffe ihre Bindung an rhE-Selektin aufrecht zu erhalten und sich erst durch Elution von dem Protein lösten. In den danach folgenden Selektionsrunden wurde die Menge an DNA-Molekülen, die nach der Prä-Selektion in die nächste Selektionsrunde eingesetzt wurde reduziert, während die Waschschriffe nach der Selektion weiterhin proportional zu den jeweiligen Selektionsrunden gesteigert wurden. Für die Selektionsrunden 14 – 16 wurden 12, 10 bzw. 9 pmol DNA eingesetzt. Trotz steigender Anzahl an Waschschriffen und gering eingesetzter DNA wurde schon nach 8, 6 bzw. 7 PCR-Zyklen ein PCR-Produkt erhalten. Nachdem bei der Selektionsrunde 17 mit nur 8 pmol DNA und 17 Waschschriffen schon nach 12 PCR-Zyklen ein Produkt detektiert werden konnte, wurde von einer ausreichenden Anreicherung von rhE-Selektin-spezifischen DNA-Aptameren ausgegangen. Somit wurde die Selektion von DNA-Aptameren mit spezifischer Affinität für rhE-Selektin nach 17 Selektionsrunden abgeschlossen und mittels Filter-Retentions-Assay (FRA) untersucht.

Bei der FRA wurde die Interaktion zwischen konstanten Mengen an radioaktiv markierter DNA mit verschiedenen Protein-Konzentrationen untersucht. Die Filtration der Protein-Aptamer-Gemische über eine Nitrocellulose-Membran ermöglichte die Trennung von nicht gebundenen DNA-Molekülen, welche die Membran passieren, von gebundener DNA, die aufgrund ihrer Bindung an das Membran-gebundene Protein zurückgehalten und detektiert werden konnten. Während keine Bindung zwischen DNA-Molekülen aus der Selektionsrunde 1 und rhE-Selektin mittels FRA zu detektieren war, wurde 20% Bindung zwischen DNA-Molekülen aus der Selektionsrunde 17 und rhE-Selektin detektiert. Somit wurde mittels FRA eine 20%ige Anreicherung an rhE-Selektin-bindenden DNA-Molekülen aus der Selektionsrunde 17 im Vergleich zur ersten Selektionsrunde ermittelt. Um ein Maß für die Stärke der Interaktion zwischen den bindenden DNA-Molekülen aus der Selektionsrunde

17 und rhE-Selektin ermitteln zu können, wurde die Dissoziationskonstante (K_d) berechnet. Der Wert von 170 nM lässt auf eine relativ starke Interaktion zwischen Aptamer und Target schließen.

Eine alternative Methode zur Ermittlung der Bindungsaffinität zwischen den Aptameren und dem Zielprotein stellt die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) dar, bei der das Protein auf einem Metall-Chip immobilisiert und die Bindung der darüber gepumpten Moleküle an das Protein spektroskopisch ermittelt wird.¹⁰⁵ Diese Methode benötigt jedoch im Vergleich zur FRA ein Vielfaches an Proteinen. Eine weitere Alternative zur Messung der Protein-Aptamer-Interaktion ist der *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA).¹⁰⁶ Beim EMSA findet analog zum FRA zunächst die Interaktion zwischen radioaktiv markiertem Aptamere und dem Protein statt. Die Trennung zwischen gebundenen und ungebundenen Aptameren erfolgt jedoch nicht über eine Nitrocellulose-Membran, sondern über ein natives Gel mittels Elektrophorese. Ein Problem ist dabei die geringere Sensitivität des EMSA. Deshalb wurden die Bindungsstudien routinemäßig mittels FRA durchgeführt.

5.2.4 KOLONIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER SELEKTIN-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMERE SDA1 UND SDA2

Zur Vereinzelung und Identifizierung der vorhandenen DNA in der Selektionsrunde 17 wurde die TA-Klonierung verwendet. Dabei konnten die DNA-Moleküle unverändert und ohne neuen Primer in den Vektor ligiert werden. Die Klonierung ergab 48 positive Kolonien, die zur Sequenzierung eingeschickt wurden. Dies führte jedoch zu keinem eindeutigen Hinweis auf die Anreicherung einer bevorzugten Sequenz. Aus dem Alignment der 30 erhaltenen Sequenzen gingen zwei Hauptzweige hervor, wobei es sich bei dem ersten Zweig lediglich um eine Sequenz (E-Sel-R17-K8) handelte, während der zweite Zweig erneut aus zwei Verzweigungen bestand. Der erste Zweig bestand aus nur einer Sequenz (E-Sel-R17-K63) und der zweite aus zwei Ästen. Der erste Ast verzweigt sich in zwei Ästen, die insgesamt 7 Sequenzen enthielten. Der zweite bestand aus mehreren Verzweigungen und bildete die größte Verzweigung mit insgesamt 21 Sequenzen. Aus dem durch das Alignment erhaltenen phylogenetischen Baum ergaben sich vier Sequenzen, die jeweils zweimal vertreten waren. Die vier Sequenzen zeigten jedoch nach einem FRA keine Affinität für rhE-Selektin. Aus den daraufhin erfolgten Einzeluntersuchungen mittels FRA wurden drei E-Selektin-bindende DNA-Moleküle E-Sel-R17-K78, K29 und K86, identifiziert. Da die Bindung zwischen rhE-

Selektin und dem DNA-Molekül E-Sel-R17-K78 nicht reproduzierbar war, wurde der Schwerpunkt der weiteren Charakterisierungen auf die beiden verbliebenen DNA-Aptamere gelegt, die als Selektin-bindende DNA-Aptamere SDA1 und SDA2 bezeichnet wurden. Beide Aptamere treten in dem phylogenetischen Baum in zwei getrennten Ästen auf.

Da der phylogenetische Baum sich hier aus nur 30 Sequenzen zusammensetzt, kann keine Aussage über die Gesamtheit der Nucleinsäuren aus der Selektionsrunde 17 getroffen werden. Dazu wäre die Sequenzierung der gesamten, in der Selektionrunde 17 vorhandenen DNA-Moleküle mittels *Next Generation Sequencing* notwendig gewesen, dessen Alignment zu einer vollständigen Charakterisierung der Selektionsrunde 17 geführt hätte.⁷⁸ Jedoch ist eine Sequenzierung mittels *Next Generation Sequencing* mit sehr hohen Kosten verbunden und da aus den 48 zur Sequenzierung eingeschickten Plasmiden die beiden Aptamere SDA1 und SDA2 ermittelt werden konnten, wurde auf den angesprochenen *Deep Sequencing*-Schritt verzichtet.

5.3 SDA1 UND SDA2, rhE-SELEKTIN-SPEZIFISCHE DNA-APTAMERE

5.3.1 BINDUNG DER APTAMERE AN DIE ZIELPROTEINE

Um die Stärke der Interaktion zwischen den selektierten DNA-Aptameren und rhE-Selektin zu quantifizieren, wurde die Dissoziationskonstante (K_d) mittels Filter-Retentions-Assay ermittelt. Für die Aptamere SDA1 und SDA2 wurden bei einer maximalen Bindung von ca. 20% Dissoziationskonstanten von 87 ± 12 nM bzw. 97 ± 15 nM errechnet. In der Literatur war ein E-Selektin-spezifisches Thio-modifiziertes DNA-Aptamer (ESTA) mit einem K_d -Wert von 47 nM beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte dieses Aptamer in Kontrollexperimenten allerdings keine Bindung an rhE-Selektin. Der pan-Selektin-Antagonist GMI-1070, eine Glycomimeticum, weist einen IC_{50} -Wert von 4.3 μ M auf. Somit sind SDA1 und SDA2 die besten zurzeit bekannten E-Selektin-spezifischen Aptamere.

Aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz von E- und P-Selektin^{13,107-109} wurde auch die Bindung von SDA1 und SDA2 an rhP-Selektin mittels FRA untersucht. Die Bindungsstudien zeigten, dass beide Aptamere auch an rhP-Selektin binden. Dabei wurden ähnliche K_d -Werte wie für rhE-Selektin ermittelt. Die in der Literatur beschriebenen P-Selektin-spezifischen modifizierten RNA-Aptamere, ARC5690 (K_d -Wert: 15 pM) und PF377 (K_d -Wert: 50 pM), weisen eine höhere Target-Affinität auf als die hier beschriebenen Aptamere SDA1 und

SDA2. Allerdings sind Letztgenannte nach den bisherigen Erkenntnissen die einzigen unmodifizierten DNA-Aptamere, die in der Lage sind, sowohl an E- als auch an P-Selektin zu binden. Lediglich das Glycomimeticum GMI-1070 kann sowohl an E-Selektin (IC_{50} -Wert: 4.3 μ M) als auch an P-Selektin (IC_{50} -Wert: 0.4 mM) binden. Allerdings stellen die zu großen, *in vitro* ermittelten Dissoziationskonstanten hierbei eventuell einen Nachteil für *in vivo* Versuche dar.

Weitere Bindungsstudien führten zu dem Ergebnis, dass SDA1 und SDA2 auch in der Lage sind, an murine Selektine zu binden, allerdings mit einem viel schlechteren K_d -Wert (genauer Wert konnte nicht ermittelt werden). Dabei erreichte SDA1 bei einer rmE-Selektin-Konzentration von 500 nM eine Bindung von ca. 40%, während weniger als 10% Bindung bei dieser Konzentration zwischen SDA1 und rmP-Selektin ermittelt werden konnten. Diese Bindung zwischen SDA1 und rmP-Selektin ist ähnlich schlecht wie auch die Bindung zwischen SDA1 und rhP-Selektin. Im Falle des SDA2 wurde eine maximale Bindung von ca. 100 bzw. 20% bei einer rmE- bzw. rmP-Selektin-Konzentration von 500 nM erreicht. Jedoch konnten auch hier keine Dissoziationskonstanten berechnet werden, da die maximal mögliche Bindung nicht ermittelt wurde.

Somit zeigten beide Aptamere höhere Affinitäten für rmE-Selektin als für rmP-Selektin. Dies entspricht das Verhalten von SDA1 und humanen Selektinen. Im Gegensatz dazu zeigte SDA2 im Falle der humanen Selektine ungefähr die gleiche Affinität sowohl für rhE- als auch für rhP-Selektin, während im Falle der murinen Selektine eine größere Affinität für rmE-Selektin als für rmP-Selektin ermittelt wurde.

Die Sequenzhomologie zwischen humanen und murinen Selektine ist der Grund für die Bindung der für humane Selektine selektierten Aptamere an murine Selektine. Zwischen humanen und murinen E- bzw. P-Selektinen besteht eine Sequenzhomologie von 72%.²³ Der Grund für die unterschiedliche Bindungsaffinität der Aptamere für humane im Vergleich zu murinen Selektinen kann an einem minimalen Sequenzunterschied zwischen humanen und murinen Selektine liegen.

Zur Kontrolle, dass die Aptamere nur spezifisch an E- und P-Selektine binden, wurde ein FRA mit Streptavidin durchgeführt. Die Bindungsstudien ergaben, dass die Aptamere nicht unspezifisch an Streptavidin binden. Eine weitere Kontrolle wurde mit DNA-Molekülen gemacht, die dieselben konstanten, aber andere randomisierte Regionen als die Aptamere

aufwiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine beliebige DNA nicht in der Lage ist, eine Bindung mit den Selektinen einzugehen.

5.3.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG DNA-APTAMERE SDA1 UND SDA2

Zur weiteren Charakterisierung der Aptamere wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei absorbieren Oligonucleotide, abhängig von ihrer Faltung und von der Anzahl der Basenzusammensetzung, links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich.¹¹⁰ Die CD-spektroskopischen Vor-Studien wurden sowohl im Selektionspuffer als auch in Tris-HCl durchgeführt. Durch die erhaltenen identischen CD-Spektren konnte eine Puffer-abhängige Faltung der Aptamere ausgeschlossen werden. Um eine Einheitlichkeit der CD- und UV-spektroskopischen Studien für die Sekundärstrukturaufklärung zu garantieren und mögliche Nebeneffekte durch die Pufferreagenzien auszuschließen, wurden die Experimente in Tris-HCl durchgeführt. PBS eignet sich aufgrund seiner Zusammensetzung weniger für UV-spektroskopische Studien.¹¹¹ Für die 91 nt langen Aptamere wurden ähnliche CD-Spektren ermittelt, die positive Maxima bei 220 und 280 nm und negative bei 210 und 245 nm zeigten. Die Ähnlichkeit der CD-Spektren ist eventuell zum Teil auf die identischen Primer-Bereiche zurückzuführen. Die für die Aptamere ermittelten CD-Spektren wiesen auf eine B-DNA Faltung hin. Das doppelsträngige, rechtsgängige Faltungsmuster der B-DNA Struktur gehört zu den in der Natur am häufigsten vorkommenden Anordnungen und zeigt negative Elliptizitäten bei Wellenlänge von ca. 205 und 245 nm, und positive bei 260 - 280 und 220 nm.^{110,112} Als Positiv-Kontrolle wurde eine 60 bp lange dsDNA mit untersucht. Diese zeigte im CD-Spektrum den gleichen Kurvenverlauf wie bei den untersuchten Aptameren SDA1 und SDA2 und bestätigte somit deren prognostizierte Struktur einer doppelsträngigen, rechtsgängigen Helix. Ein kurzes einzelsträngiges DNA-Molekül (D1-Primer-Rev) wurde als Negativ-Kontrolle ebenfalls untersucht. Dies zeigte lediglich im Fern-UV-Bereich eine positive Elliptizität bei ca. 220 nm und im Nah-UV-Bereich eine niedrige Elliptizität bei ca. 270 nm und wies somit ein von den Aptameren und der Kontroll-DNA abweichendes CD-Spektrum auf. Das kurze einzelsträngige DNA-Molekül zeigte somit keine B-Form im CD-Spektrum, was auch nicht zu erwarten war.

Die Untersuchungen bei zunehmenden Temperaturen zeigen das Aufbrechen der für die Sekundär- und Tertiärstruktur unter anderem mitverantwortlichen Wasserstoffbrücken. Im

Vergleich zur Kontroll-DNA verändert sich das CD-Spektrum der Aptamere schon bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 37 °C. Die Spektren bei 37 und 50 °C unterschieden sich weniger voneinander. Dies kann auf eine Destabilisierung bzw. Veränderung der Struktur zurückgeführt werden, dessen Fortsetzung bei den nächsten Temperaturerhöhungen zu beobachten war.

Um einen Anhaltspunkt für den T_m -Wert und somit die Stabilität der beiden Aptamere zu erhalten, wurde der theoretische T_m -Wert mittels *UNAFold* berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass die mittels *Mfold* ermittelte Sekundärstruktur für SDA1 bei 50°C ihre Schmelztemperatur erreicht hätte, während die für SDA2 ermittelte Sekundärstruktur schon bei 38 °C seinen T_m -Wert erreichte. Demzufolge muss in Betracht gezogen werden, dass eventuell andere Sekundärstrukturen von den Aptameren ausgebildet werden, die für die erhaltenen CD-Spektren bei höheren Temperaturen mitverantwortlich sind. Deshalb wurde mittels *UNAFold* eine eventuell Komplementarität der Aptamere überprüft. Die daraus resultierenden Dimer-Strukturen wiesen eine höhere thermodynamische Stabilität gegenüber den Monomeren auf. In Abbildung 45 sind die mittels *UNAFold* dargestellten Sekundärstrukturen bei verschiedenen Temperaturen und die daraus resultierenden minimalen freien Faltungsenergien für SDA1 als Monomer (A) bzw. als Dimer (B) dargestellt. Somit wurde die Struktur der Aptamere bei den jeweiligen temperaturabhängigen CD-Kurven näherungsweise ermittelt.

Wie aus Abbildung 45 B ersichtlich, könnte SDA1 als Dimer bei 20 °C eine ca. doppelt so stabile Struktur ausbilden als das Monomer. Geht man davon aus, dass SDA1 aufgrund der günstigeren minimalen freien Faltungsenergie zum größten Teil als Dimer in Lösung vorliegt, wäre das erhaltene CD-Spektrum das Resultat aus zwei Sekundärstrukturen, die sich abhängig von der Temperatur verändern. Die Erhöhung der Temperatur von 20 auf 37 °C führt schon zu einer Strukturveränderung, welche sich im CD-Spektrum widerspiegelt. Ebenfalls führt die Temperaturveränderung von 37 auf 50 °C zu einer Strukturveränderung. Hierbei ist aufgrund der minimalen freien Faltungsenergie des Monomers (-1.18 kcal/mol) davon auszugehen, dass bei 50 °C nur noch SDA1 als Dimer vorliegt. Die Erhöhung der Temperatur auf 80 °C führt zu einer Auflösung der gesamten Struktur bis zu einem kleinen *Loop* bei SDA1 als Dimer, weshalb auch im CD-Spektrum die Elliptizität in Fern-UV auf Null zurückgeht. Somit ist anzunehmen, dass die Schmelztemperatur für SDA1 im Bereich zwischen 50 - 80 °C liegt.

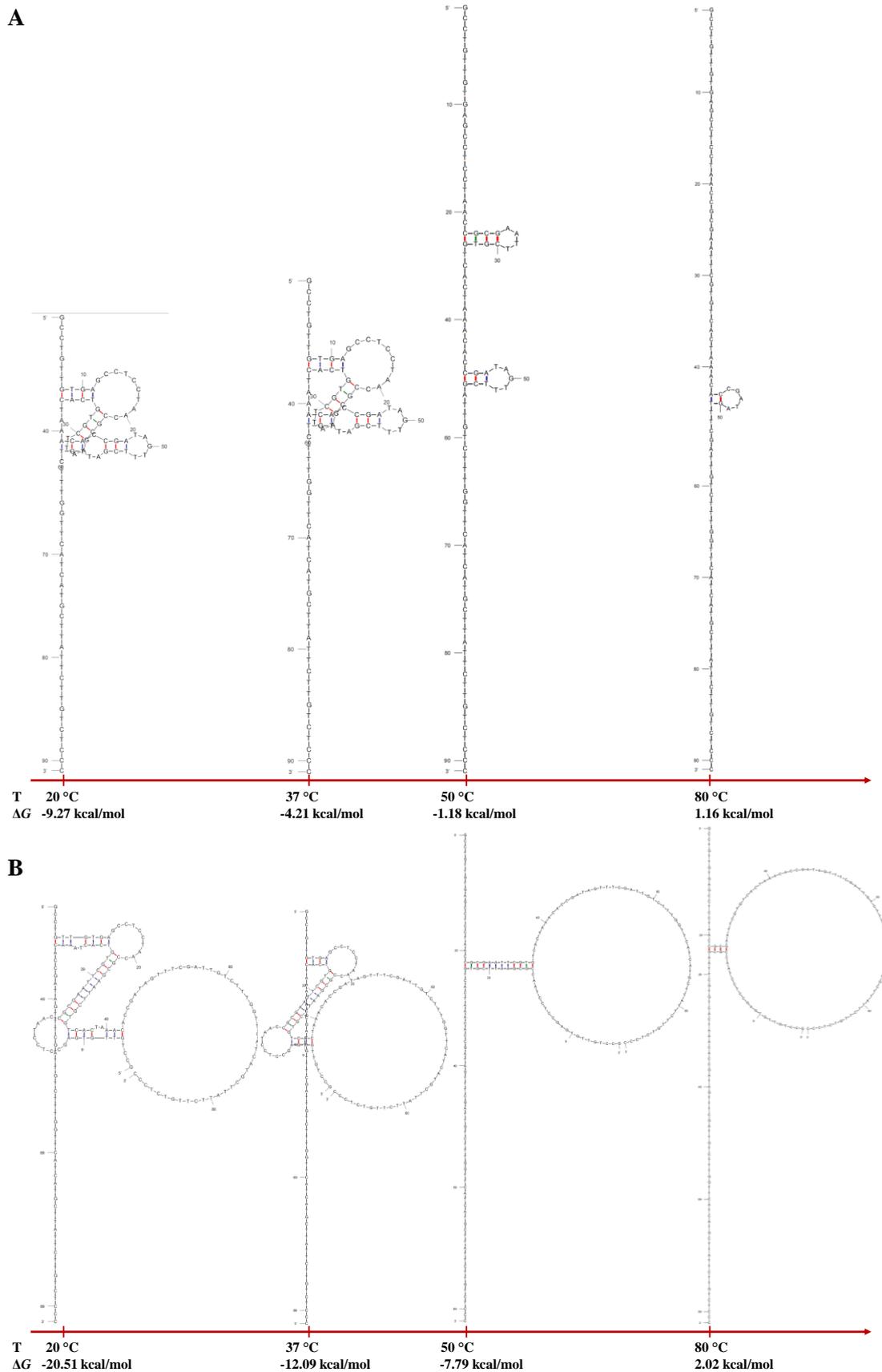


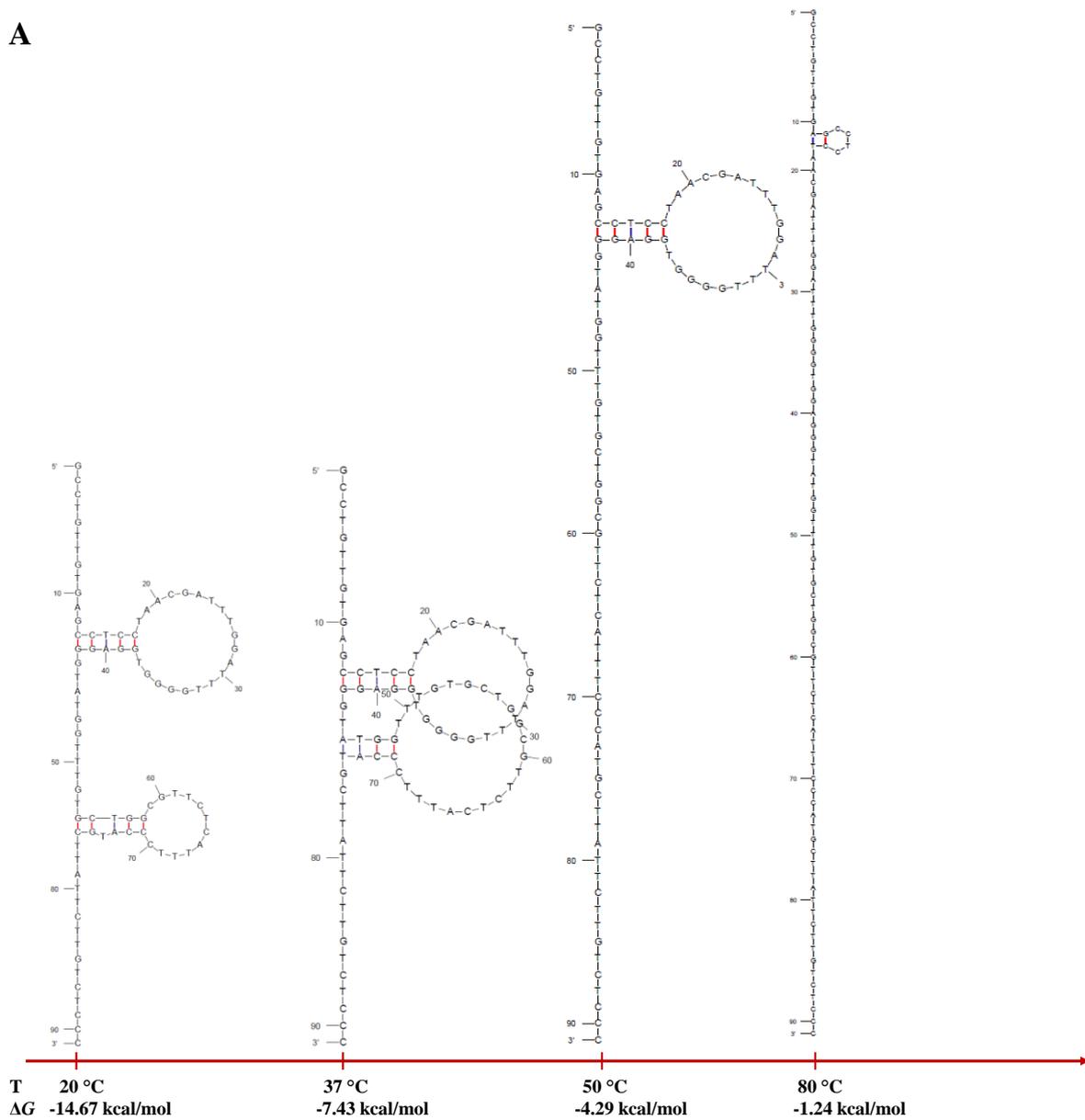
Abbildung 45: Sekundärstrukturvorhersage für SDA1. Mittels *UNAFold* konnten unterschiedliche Sekundärstrukturvorhersagen mit der entsprechenden minimalen freien Faltungsentnergie (ΔG) für SDA1 als Monomer (A) bzw. als Dimer (B) bei unterschiedlichen Temperaturen (T) ermittelt werden.

Abbildung 46 zeigt die unterschiedlichen Sekundärstrukturen für SDA2 als Monomer (A) bzw. als Dimer (B) bei verschiedenen Temperaturen. Wie bereits SDA1 bildet auch SDA2 als Dimer eine stabilere Struktur im Vergleich zum Monomer aus. Da der theoretische T_m -Wert des SDA2 Monomers bei 38 °C liegt, muss davon ausgegangen werden, dass SDA2 bei der Aufnahme der CD-Spektren zum größten Teil als Dimer vorlag. Dies kann ein Grund für die relativ niedrige Elliptizität verglichen mit SDA1 sein, welches als Gemisch aus Monomeren und Dimeren vorzuliegen schien.

Auch SDA2 verändert seine Struktur mit der Erhöhung der Temperatur, was durch die Verschiebung der Minima und Maxima in Richtung einer Elliptizität von Null zu beobachten war. Der Unterschied zwischen den einzelsträngigen Aptameren, die nur zum Teil Doppelstrang-Regionen aufwiesen und der dsDNA-Kontrolle, die kontinuierlich aus Doppelstrang-Regionen bestand, kann dazu geführt haben, dass die Aptamere bei verschiedenen Temperaturen unterschiedliche Faltungen aufwiesen, die dsDNA aufgrund ihrer festgelegten Struktur jedoch erst beim Erreichen der Schmelztemperatur eine Strukturveränderung aufwies. Dies erklärt auch die beobachtete Veränderung des CD-Spektrums der dsDNA-Kontrolle von 50 auf 80 °C, wobei die Kontrolle bei den anderen getesteten Temperaturen ein konstantes Spektrum aufwies. Die im Vergleich zu den Aptameren relativ niedrige Elliptizität von ca. 2×10^4 deg cm²/dmol der dsDNA kann auf deren relativ geringe Kettenlänge (60 bp) im Gegensatz zu der der Aptamere (91 nt) zurückgeführt werden.

Bei 37 °C bilden die Aptamere die in Abbildung 45 bzw. Abbildung 46 dargestellten Sekundärstrukturen aus. Es ergibt sich für SDA1 als Mono- bzw. als Dimer eine theoretische Schmelztemperatur von 51 bzw. 48 °C und für SDA2 von 38 bzw. 53 °C. Die experimentellen UV-spektroskopischen Bestimmungen der Schmelztemperatur unter Verwendung der van't-Hoff-Gleichung ergaben für SDA2 einen T_m -Wert von 70 °C und für die Kontroll-DNA einen T_m -Wert von 65 °C. Für SDA1 konnte mittels UV-Spektroskopie keine Schmelztemperatur ermittelt werden. Die für SDA2 erhaltene Schmelzkurve zeigt bei ca. 25 °C eine Veränderung des Absorptionsverhaltens, welches auf die Auflösung der Monomere bzw. Dimere zurückgeführt werden könnte. Oberhalb ca. 30 °C ist die Absorption der Dimere zu beobachten, die erst bei ca. 70 °C ihren T_m -Wert erreicht und ihr Absorptionsverhalten verändert.

A



B

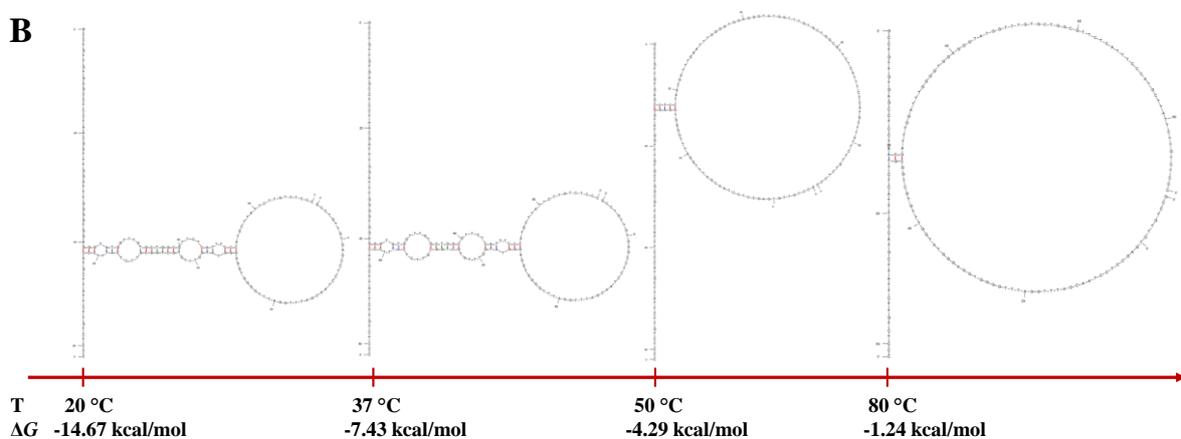


Abbildung 46: Sekundärstrukturvorhersage für SDA2. Mittels *UNAFold* konnten unterschiedliche Sekundärstrukturvorhersagen mit der entsprechenden minimalen freien Faltungsenergie (ΔG) für SDA2 als Monomer (A) bzw. als Dimer (B) bei unterschiedlichen Temperaturen (T) ermittelt werden.

Der Grund für die abweichenden T_m -Werte liegt an den unterschiedlichen Methoden, die für die Berechnung angewendet wurden. Bei den theoretischen T_m -Wert wurde der von dem Program *UNAFold* vorgeschlagene T_m -Wert übernommen, während es sich bei dem aus den UV-spektroskopischen Untersuchungen ergebende T_m -Wert um tatsächliche Berechnungen basierend auf der van't-Hoff-Gleichung handelt. Jedoch konnte mittels Vergleich zwischen den theoretischen und experimentell bestimmten T_m -Werten der Grund für die Temperaturabhängige Veränderung der CD-Kurven diskutiert werden. Auch die eventuell vorhandenen Aptamer-Dimere konnten somit ermittelt werden. Die somit aufgestellte Annahmen, dass die Aptamere überwiegend als Dimere vorlagen, muss experimentell bestätigt werden. Dies würde auch eine eventuelle Veränderung der ermittelten Dissoziationskonstanten mit sich bringen.

5.3.3 DIE VERKÜRZUNG DER APTAMERSEQUENZ FÜHRT ZUM VERLUST DER BINDUNGS-AFFINITÄT

Eine Verkürzung der 91 nt langen DNA-Aptamere zur Ermittlung des minimalen Bindemotivs erfolgte auf Basis der Sekundärstrukturvorhersage des Programms *Mfold* wie im Methodenteil beschrieben. Beide untersuchten Varianten SDA1-M1 (53 nt) und SDA2-M1 (62 nt) zeigten keinerlei Bindung an die Zielproteine.

Die Verkürzung hätte zum einen zur Aufklärung des minimalen Bindemotivs der Aptamere und zum anderen zur Kostenminimierung beitragen können. Gegen eine zu starke Minimierung von für den *in vivo*-Einsatz vorgesehenen Aptameren spricht allerdings die Tatsache, dass Aptamere erst oberhalb eines Molekulargewichtes von 40 kDa einem schnellen Abbau in den Nieren entgehen.⁷¹ Für die Aufklärung des Bindemotivs hätte alternativ zur hier angewendete Strategie die *Damage-Selection* angewendet werden können. Bei der *Damage-Selection* wird die Bindung zwischen dem Target-Protein und Spaltprodukten der Aptamere nach alkalischer Hydrolyse untersucht. Eine *Damage-Selection* hätte jedoch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt und wurde deshalb nicht durchgeführt.

Bei zukünftigen Experimenten bezüglich einer erfolgreichen Minimierung der Aptamere muss nicht nur die Bindung der Aptamere an die Selektinen beachtet werden. Ebenfalls muss auch die Erhaltung der herausgefundenen inhibitorischen Wirkung der Bindung zwischen den Aptameren und den Selektinen weiterhin bestehen bleiben.

5.3.4 SDA1 UND SDA2 SIND ÜBER LÄNGERE ZEIT SERUMSTABIL

Für Zell-Experimente muss die Stabilität der Aptamere in Vollmedium gewährleistet sein. Dieses beinhaltet die für die Zellen erforderlichen Nährstoffe sowie Antibiotika und wird durch Zusatz von FKS und PenStrep ergänzt. FKS beinhaltet nicht nur Wachstumsfaktoren, sondern neben verschiedenen Aminosäuren, Vitaminen und Lipiden auch Nucleasen, die zum Abbau von Nucleinsäuren führen können.^{113,114} Zur Ermittlung der Serumstabilität von SDA1 und SDA2 wurden die radioaktiv-markierten Aptamere bei Raumtemperatur in Vollmedium inkubiert und anschließend analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl SDA1 als auch SDA2 über mehrere Stunden im Vollmedium stabil waren und nur partiell degradiert wurden. Nach 60 Minuten waren noch mehr als 60% und nach 12 Stunden mehr als 20% Vollängen-DNA vorhanden, wobei SDA2 gegenüber SDA1 10% mehr Stabilität zeigte. Eine Erklärung für die höhere Stabilität von SDA2 könnte aus der ebenfalls stabiler erscheinenden Sekundärstruktur abgeleitet werden, wenn man unterstellt, dass mit einer erhöhten Sekundär- auch eine stabilere Tertiärstruktur korreliert; wobei Stabilität in diesem Fall eine Struktur-bedingte schlechtere Zugänglichkeit für Nucleasen bedeuten kann. Diese Stabilität war Voraussetzung für die weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Experimente in Vollmedium. Für *in vivo*-Untersuchungen bzw. Langzeit-Experimente ist sie jedoch sicher noch nicht ausreichend.

Während unmodifizierte RNA-Aptamere üblicherweise innerhalb von Minuten im Vollmedium abgebaut werden,^{115,116} weisen kurze DNA-Aptamere eine relativ hohe Stabilität auf; wie das VEGF₁₆₅ spezifische 26 nt lange Aptamer SL2-B,¹¹⁷ welches erst nach 24 Stunden zu 50% in Vollmedium abgebaut ist.¹¹⁸ Ein Vergleich zwischen den in der Humantherapie zugelassenen Aptameren, wie dem VEGF-spezifischen modifizierten RNA-Aptamer Macugen oder TLR9 spezifischen modifizierten DNA Aptamer IMO2055, zeigt,^{81,119} dass bis jetzt nur modifizierte Aptamere eine medizinische Anwendung gefunden haben.⁷⁹ Dies ist eventuell mit der hohen Stabilität, welche durch Modifikationen erreicht wird, zu begründen. Um SDA1 sowie SDA2 in Langzeit-Untersuchungen einsetzen zu können, muss deren Stabilität erhöht werden. Eventuell könnte eine erfolgreiche Verkürzung zu einer Erhöhung der Stabilität beitragen.¹²⁰ Zusätzlich könnten Modifikationen wie z. B. eine PEG-Addition⁷¹ an den Enden oder alternativ eine Zirkularisierung der Aptamere, also die Verknüpfung von 5' und 3' Ende, deren Stabilität zusätzlich erhöhen. Der Einbau von Phosphorthioaten gegen Degradationen mittels Endonuclease könnte ebenfalls zur Stabilitätssteigerung beitragen.¹²¹

5.4 IN VITRO ZELLKULTUR-MODELL ZUR SIMULATION DER SELEKTIN LIGAND - SELEKTIN APTAMER INTERAKTION

5.4.1 DIE SELEKTIERTEN APTAMERE INHIBIEREN DIE SELEKTIN SELEKTIN-LIGAND-INTERAKTION UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN

Wie in der Einleitung näher ausgeführt, stellt die Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen an das Endothelium einen entscheidenden initialen Schritt der Metastasierung dar. Um diesen initialen Schritt in der Migration von Tumorzellen zu unterbinden, müsste die Interaktion zwischen den Selektinen und deren Liganden blockiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde zuerst die Interaktion zwischen fluoreszenzmarkierten Selektinen und HT29-Zellen in einem Durchflusszytometer nachgewiesen. Die verwendeten humanen Darm-Adenokarzinom-Grad-II-Zellen (HT29) präsentieren Sialyl-Lewis-Glykane, die für die Interaktion zwischen HT29-Zellen und den Selektinen verantwortlich sind. Die erhöhte Präsenz dieser Glykane auf der Zelloberfläche stellt ein Indiz für Tumorzellen dar.¹²⁴

Die durchgeführten durchflusszytometrischen Studien in Anwesenheit der selektierten DNA-Aptamere SDA1 und SDA2 zeigten eine Reduzierung der Bindung von fluoreszenzmarkierten Selektinen auf der Oberfläche von HT29-Zellen. Dabei wurde bei einer SDA1-Höchstkonzentration von 5 μM eine signifikante Inhibition der Interaktion zwischen rhE-Selektin und HT29-Zellen von $22.50 \pm 7.8\%$ ($P < 0.05$) erreicht. Im Fall der Kontroll-DNA bei derselben Konzentration war kein inhibitorischer Effekt zu verzeichnen (1%). Die Spezifität, der von SDA1 bewirkten Inhibition wurde in Anwesenheit eines fünffachen Überschusses an Komptitor nachgewiesen. Die gegenüber SDA1 im Überschuss vorliegende unspezifische Kontroll-DNA war nicht in der Lage, die Bindung zwischen Aptamer und rhE-Selektin zu stören, was einen weiteren Hinweis auf die hohe inhibitorische Spezifität von SDA1 lieferte. Auch der Komptitor alleine zeigte keinen inhibitorischen Effekt, so dass eine unspezifische Inhibition ausgeschlossen werden konnte.

Anders verhielt es sich bei SDA2. Hier konnte keine reproduzierbare Inhibition im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Wie die Strukturanalysen gezeigt haben, bildet SDA2 als Dimer eine stabile Struktur aus, welches eventuell für die Target-Bindung verantwortlich ist. Der Grund für die nicht immer erfolgte Reproduktion der durchflusszytometrischen Experimente kann somit mit der ungünstigen Faltung des Aptamers zusammenhängen. Dies würde bedeuten, dass SDA2 bei der Wiederholung der

Experimente nicht immer als Dimer sondern auch zeitweilig als Monomer vorlag. Um dies zu vermeiden bzw. eine optimale Faltung des Aptamers bei jeder Experiment zur gewährleisten, hätte das Aptamer vor jeder Untersuchung thermisch de- und renaturiert werden müssen.

Des Weiteren konnte die Bindung zwischen rhP-Selektin und HT29-Zellen in Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$ SDA1 um $72.50 \pm 16.3\%$ ($P < 0.05$) und in Anwesenheit von SDA2 um $76.98 \pm 6.1\%$ ($P < 0.001$) reduziert werden. Die durch die Aptamere entstandene P-Selektin-Bindungsinhibition konnte in den Kompetitionsstudien, analog zu den für rhE-Selektin durchgeführten Studien, als spezifisch und signifikant nachgewiesen werden. Somit verursachten die Aptamere eine viel größere Inhibitionsrate im Fall des rhP-Selektins verglichen mit rhE-Selektin. Der Grund hierfür kann in der unterschiedlichen Dissoziationsrate (K_{off}) und Dissoziationskonstante (K_{d}) für die Bindung zwischen E- bzw. P-Selektin und den Liganden liegen. Während die Bindungen von Selektinen an Glykoproteinen als stark beschrieben werden,^{25,125} gelten die Bindungen an Sialyl-Lewis-Glykane als schwach.^{30,31} Poppe *et al.* charakterisierte im Jahr 1996 die Bindungsaffinität zwischen Selektinen und sLe^{X} .³³ Danach ist die Dissoziationskonstante zwischen P-Selektin und Liganden um ein 10-faches schlechter als die des E-Selektins und sLe^{X} (E-Selektin K_{d} -Wert: $0.72 \pm 0.4 \text{ mM}$, P-Selektin K_{d} -Wert: $7.8 \pm 1.0 \text{ mM}$).³³ Ebenfalls ist die Dissoziationsrate zwischen P-Selektin und sLe^{X} ein 3-faches schlechter als die zwischen E-Selektin und sLe^{X} (E-Selektin K_{off} $164 \pm 24 \text{ s}^{-1}$, P-Selektin K_{off} $522 \pm 166 \text{ s}^{-1}$).³³

Da es sich bei den durchgeführten durchflusszytometrischen Experimenten um ein statisches System handelte, führte die Anwesenheit von überschüssigen Komponenten, also den verwendeten HT29-Zellen, möglicherweise zu einer Verschiebung des Gleichgewichts. Aufgrund der unterschiedlichen Dissoziationskonstanten für die Bindung zwischen Ligand und E- bzw. P-Selektin kann diese Verschiebung unterschiedlich stark sein. Folglich können die von den Zellen präsentierten Liganden zum Teil zu einer Verdrängung der an den Selektin gebundenen Aptamer geführt haben, so dass eine 100%ige Inhibition bei einer Aptamer-Konzentration von $5 \mu\text{M}$ nicht erreicht werden konnte.

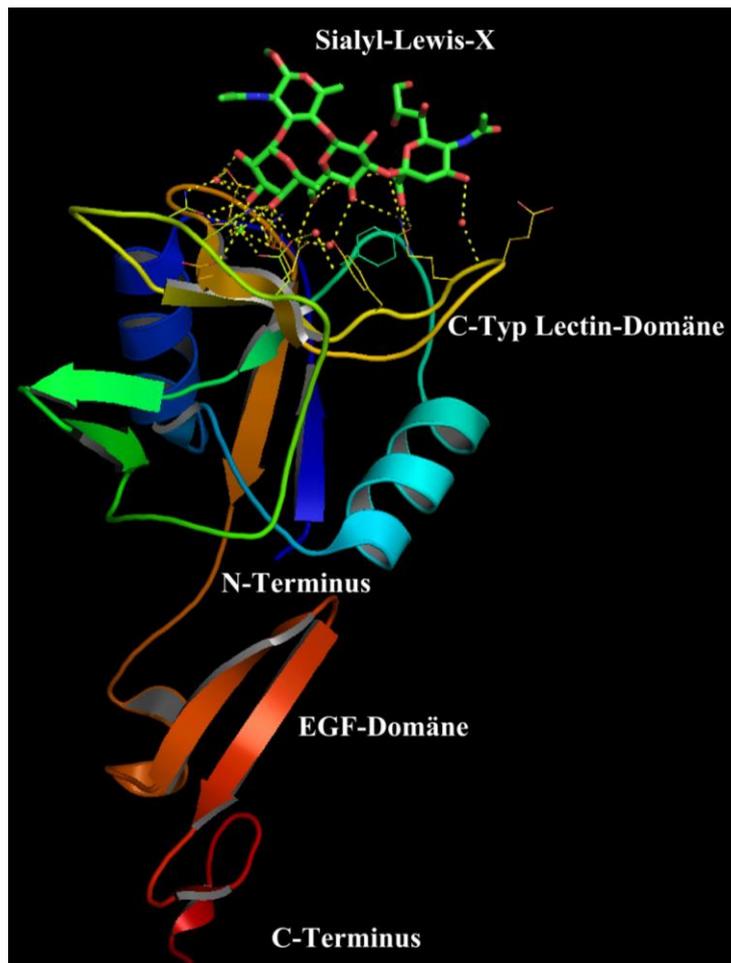


Abbildung 47: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe^X. Die gestrichelten gelben Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen sLe^X und der C-Typ Lektin-Domäne des E-Selektin dar. Das Calcium-Ion ist als grüne Sphäre abgebildet. Die Koordinaten wurden der Protein-Data-Bank (*PDB accession code*: 1G1T) entnommen. Das Protein ist im Schleifen-Format und der Ligand ist im "Sticks"-Format dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass SDA1 und SDA2 die Interaktion zwischen rhE- bzw. rhP-Selektin und Sialyl-Lewis-Antigen-präsentierenden Zellen inhibieren, und dass die Kristallstruktur der Selektine bekannt ist,¹³ kann bezüglich der Interaktion zwischen Proteinen und Aptameren spekuliert werden. Abbildung 47 zeigt die Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe^X in Anwesenheit von Calcium-Ion. Dies ist die Struktur des P-Selektins sehr ähnlich.¹³ In Abbildung 48 ist die Kristallstruktur mit den an der Liganden-Bindung beteiligten Aminosäuren in der C-Typ Lektin-Domäne von E-Selektin mit sLe^X dargestellt.

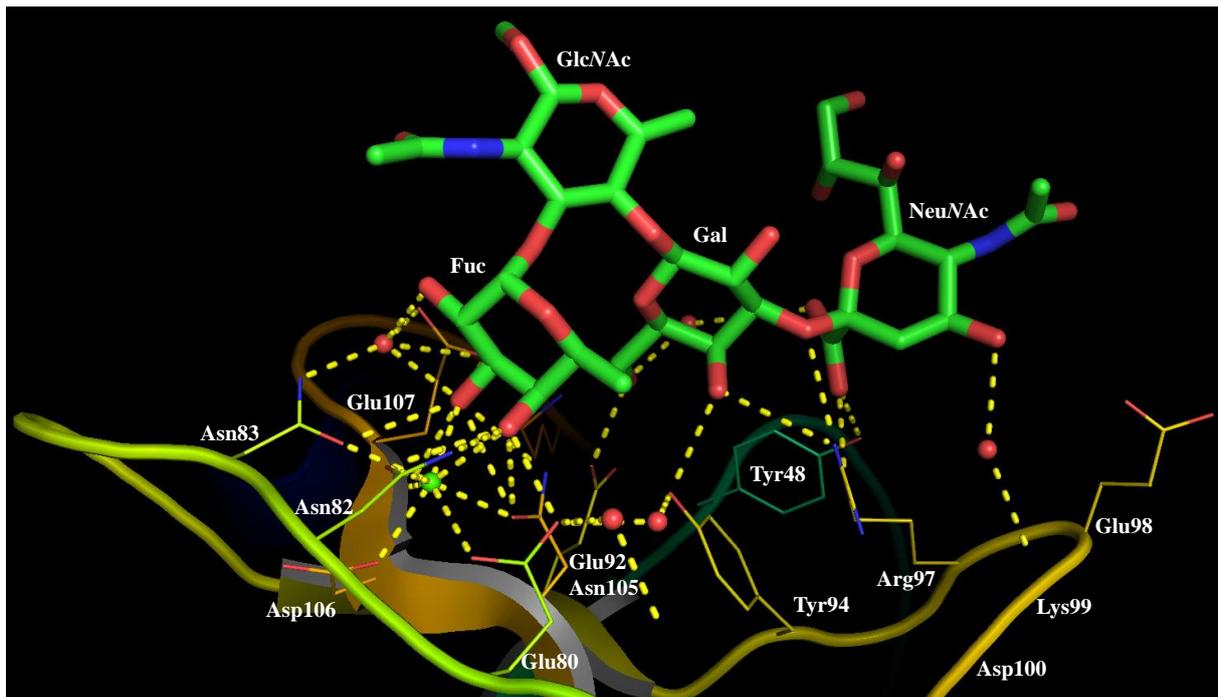


Abbildung 48: Kristallstruktur der C-Typ Lektin- und EGF-ähnlichen Domäne des humanen E-Selektins im Komplex mit dem Liganden sLe^X. Dargestellt sind die mit dem Liganden interagierenden Aminosäuren des E-Selektins und dessen Interaktion mit sLe^X. Die Interaktionen zwischen sLe^X und der C-Typ Lektin-Domäne der Selektine über Wasserstoffbrückenbindungen stellen die gelb unterbrochenen Linien dar. Ein Calcium-Ion ist als grüne Kugel dargestellt. Die Koordinaten wurden der Protein-Data-Bank (*PDB accession code*: 1G1T) entnommen. Das Protein ist im Schleifen-Format und der Ligand ist im "Sticks"-Format dargestellt.

Die aus den durchflusszytometrischen Experimenten gewonnenen Ergebnisse, dass die Selektin-Aptamer-Bindung zur Blockierung der Bindung zwischen Selektin und seinem Liganden führt, und die nachweislich belegte Beteiligung der C-Typ Lektin-Domäne der Selektine an der Liganden-Bindung, legt die Vermutung nahe, dass die Aptamere innerhalb der C-Typ Lektin-Domäne mit den Selektinen interagieren. Während die C-Typ Lektin-Domäne in E-Selektin aus 118 Aminosäuren besteht, wird sie in P-Selektin von 101 Aminosäuren ausgebildet. Jedoch sind in beiden Proteinen die Aminosäuren Glu80, Asn82, Asn105 und Asp106 für die Calcium-Ionen-Bindung verantwortlich. Die Aminosäuren, die an der sLe^X-Bindung beteiligt sind, befinden sich in beiden Proteinen an den gleichen Positionen, sind aber nicht identisch. Die sLe^X-Bindungstasche des E-Selektins wird von Arg97-Glu98-Lys-99 und Asp100 gebildet, während Ser97-Pro98-Ser99 und Ala100 innerhalb des P-Selektins die sLe^X-Bindungstasche ausbilden. Innerhalb der E-Selektin sLe^X-Bindungstasche ragt Lys99 aufgrund der durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg97 und Asp100 entstandenen positiven Ladung nach außen, während Ser99 aufgrund der Ladungsneutralität innerhalb der P-Selektin sLe^X-Bindungstasche nach innen gerichtet ist.¹³ Diese Abweichung zwischen E- und P-Selektin

innerhalb der Bindungstasche ist wahrscheinlich der Grund für die oben genannten unterschiedlichen Dissoziationskonstanten zwischen sLe^X und E- bzw. P-Selektinen. Somit ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Aminosäuren bzw. Domänen für die Interaktion zwischen den Aptamern und den Selektinen verantwortlich sind. Die Aptamere können sich entweder so in der Bindungstasche anordnen, dass die für die sLe^X-Selektin-Bindung notwendigen Aminosäuren nicht mehr frei zugänglich sind, oder sie blockieren das für die sLe^X-Selektin-Bindung essenzielle Calcium-Ion. Des Weiteren kann eine Bindung zu einer oder mehreren der folgenden Aminosäuren der Grund für den inhibitorischen Effekt der Aptamere sein; Met10, Tyr12, Tyr18, Gln20, Arg22, Asn39, Tyr44, Ser47, Tyr48, Arg54, Lys55, Asn57, Asn82, Tyr94, Lys96, Arg97, Lys99, Asp100, Met103, Lys111, Lys112, Lys111. Mutationen an diesen Aminosäuren haben nachweislich zum Verlust der Selektin-sLe^X-Affinität geführt.^{12,15} Analog dazu kann also eine Bindung der Aptamere an diese Aminosäuren deren Beteiligung an der Selektin-sLe^X-Interaktion beeinträchtigen.

5.4.2 DIE SELEKTIERTEN APTAMERE INHIBIEREN DIE SELEKTIN-LIGAND-INTERAKTION UNTER PHYSIOLOGISCH SIMULIERTEN BEDINGUNGEN

Die Aptamere wurden im statischen *in vitro*-Modellsystem als Selektin-Inhibitoren charakterisiert. Da bei den physiologischen Systemen dynamische Zustände vorherrschen, musste die Beständigkeit der Aptamer-Selektin-Bindung unter dynamisch physiologischen Bedingungen ebenfalls nachgewiesen werden. Um das *in vitro*-Zellkulturmodell soweit zu optimieren, dass die *in vivo* vorliegenden Bedingungen so gut wie möglich vorlagen, wurde ein Versuchsaufbau konstruiert, bei dem die Zellen in einem laminaren Fluss über immobilisierte rhE bzw. rhP-Selektine geleitet wurden. Somit wurde der Blutstrom in den Blutgefäßen über die Endothelzellen im menschlichen Körper nachgeahmt. Die aus dem Blutstrom resultierenden Scher-Bedingungen simulieren die späteren *in vivo*-Experimente. In diesem Modellsystem wurde die Flussstärke analog zu den in den postkapillaren Venolen herrschenden Bedingungen angepaßt, wie sie an der Stelle des lymphatischen Systems vorherrschen, an denen die Lymphocyten-Adhäsion und Migration stattfindet¹²⁶⁻¹³⁰ In dem den physiologischen Bedingungen nachgeahmtem laminaren Fluss-Assay wurde die Beständigkeit der Bindung zwischen den Aptamern und immobilisierten Selektinen bei einer Flussrate von 8 mL/h untersucht. Erfahrungsgemäß ist die Interaktion zwischen P-Selektin mit EOL-1-Zellen unter dynamischen Bedingungen anschaulicher als die Interaktion zwischen HT29-Zellen und rhP-Selektinen. Deshalb wurden die für rhP-Selektin

durchgeführten Experimente mit EOL-1-Zellen und für rhE-Selektin mit HT29-Zellen durchgeführt. SDA1 bzw. SDA2 führten zu einer 30 bzw. 35%igen Reduzierung der Interaktion zwischen HT29-Zellen und rhE-Selektin. Die Spezifität dieser Inhibition wurde durch Kontroll-DNA bestätigt. Es wurde keine Inhibition der Interaktion zwischen HT29-Zellen und rhE-Selektin in Anwesenheit der Kontroll-DNA beobachtet. Analog dazu wurde die Reduzierung der Bindung zwischen rhP-Selektin und EOL-1-Zellen in Anwesenheit der Aptamere gezeigt. Ähnlich wie bei rhE-Selektin führten SDA1 bzw. SDA2 zu einer Reduzierung der Interaktion zwischen EOL-1-Zellen und rhP-Selektin von 37 bzw. 40%. Ein Vergleich zwischen den statisch und dynamisch durchgeführten Experimenten zeigt, dass die Aptamere, unabhängig von dem Puffer bzw. Medium und unabhängig von dem den Liganden-präsentierenden-Zellen, HT29 oder EOL-1, in der Lage sind, die Interaktion zwischen Selektin und Sialyl-Lewis-Antigen präsentierenden Zellen zu blockieren.

5.4.3 DIE SELEKTIERTEN APTAMERE INHIBIEREN ZELL-ZELL-INTERAKTIONEN UNTER PHYSIOLOGISCH SIMULIERTEN BEDINGUNGEN

Die Bindungsinhibition der Selektine durch die Aptamere unter Scher-Bedingungen ermutigte dazu, in einem erweiterten Modellsystem die Untersuchung der Wirkung von SDA1 und SDA2 auf Zell-Zell-Interaktionen zu untersuchen. Dabei stellte das *in vitro*-Testsystem eine weitere Annäherung an die unter natürlichen Bedingungen herrschenden Bedingungen dar. Hierbei wurde die Interaktion zwischen den E-Selektin-präsentierenden HPMEC und Sialyl-Lewis-Antigen-präsentierenden HT29-Zellen in Anwesenheit der Aptamere SDA1 und SDA2 in einem laminaren Fluss-Assay untersucht. Die von HPMECs auf der Oberfläche präsentierten E-Selektine wurden zunächst mit SDA, SDA2 bzw. einer Kontroll-DNA präinkubiert und anschließend unter Scher-Bedingungen einem Fluss von HT29-Zellen ausgesetzt. Im Gegensatz zur Kontroll-DNA, die keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen HPMECs und HT29-Zellen zeigte, inhibierten sowohl SDA1 als auch SDA2 die Bindung zwischen den Zellen um 38 bzw. 54% ($P < 0.05$ quantifiziert auf stimulierte HPMEC ohne DNA bzw. mit Kontroll-DNA). Dies war ein eindeutiger Beweis für das inhibitorische Potenzial der Aptamere bei der Zell-Zell-Interaktion unter simulierten physiologischen Bedingungen.

Die selektierten und als E- und P-Selektin-Inhibitoren identifizierten DNA-Aptamere SDA1 und SDA2 sind nach den momentanen Kenntnissen die einzigen DNA-Aptamere, die in der Lage sind, sowohl E- als auch P-Selektin zu inhibieren und stellen neben den Glykomimetica wie z.B. GMI-1070 und TBC-1269 und dem P-Selektin RNA-Aptamer ARC5690 eine gute Alternative zur Unterbindung der Metastasierung dar.^{70,71,93,131}

AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war die Selektion und Charakterisierung von E-Selektin-spezifischen DNA-Aptameren als mögliche E-Selektin-Inhibitoren.

Die Selektion E-Selektin-spezifischer DNA-Aptamere wurde mittels SELEX realisiert. Es wurden die beiden unmodifizierten DNA-Aptamere SDA1 und SDA2 selektiert, die in der Lage sind hoch affin an rhE- und aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten an rhP-Selektine zu binden. Ebenfalls konnte die Bindung der Aptamere an rmE- und rmP-Selektine nachgewiesen werden. Durch Zellkultur-Modelle wurden die Aptamere als rhE- und rhP-Selektin-Inhibitoren spezifiziert.

Für eine spätere *in vivo*-Anwendung sollten beide Aptamere über eine höhere Serumstabilität verfügen. Dabei könnten Modifikationen, wie z. B. eine Konjugation mit Polyethylenglykol, das einen zügigen renatalen Abbau verzögert, oder auch eine Zirkularisierung der Aptamere Erfolge bringen. Abschließend sollten Stabilitäts-Experimente im Blutplasma durchgeführt werden, um eine frühzeitige Degradation der Aptamere in *in vivo* Untersuchungen ausschließen zu können.

Zusätzlich sollte die Dissoziationskonstante für die Bindung von SDA1 bzw. SDA2 an murine Selektine sowie deren IC_{50} -Werte ermittelt werden. Dies sollte unter anderem auch zur Ermittlung der richtigen Dosisierung für *in vivo* Experimente dienen, da diese zunächst in Mäusen stattfinden.

Nähere Untersuchungen mit E- bzw. P-Selektin-präsentierenden Zellen sollten zur Aufklärung einer eventuellen Internalisierung der Aptamere durchgeführt werden. Eine eventuell erfolgreiche Internalisierung der Aptamere konnte für Wirkstoff-Transport benutzt werden.

Ebenfalls sollte geklärt werden, ob die Aptamere als Mono- oder Dimere an ihre Targets binden. Ferner sollte mittels Kompetitions-Analysen aufgeklärt werden, ob SDA1 und SDA2

mit denselben Aminosäuren der Selektine interagieren. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte ein Dimer aus SDA1 und SDA2 eine noch bessere Inhibition zeigen. Hierbei wäre eine vorherige erfolgreiche Minimierung der einzelnen Aptamere möglicherweise hilfreich.

Mittels *Damage-Selektion* sollten die für die Target-Interaktion zuständigen Nucleotide innerhalb der Aptamere identifiziert und eine geeignete Minimalsequenz der Aptamere ermittelt werden. Anschließend sollten Zellkultur-Modelle den Erhalt des inhibitorischen Charakters der Aptamere experimentell bestätigen.

Es sollten Kristallisationsexperimente mit den Aptamer-Target-Komplexen unternommen werden, um im Erfolgsfall aus der Röntgenstrukturanalyse detailliertere Einblicke in die Struktur-Funktions-Beziehung zu erlangen.

Im Anschluss an diese Arbeit konnte SDA2 erfolgreich an Quantum-Dots gekoppelt werden. Dies geschah in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Weller. Sollten weitere *in vitro* gefolgt von *in vivo* Experimente mit dem Aptamer-Quantum-Dots-Konjugat erfolgreich verlaufen, könnten die Aptamere mit Hilfe der Quantum-Dots *in vivo* detektiert werden.

LITERATUR

1. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an Inducible Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 1987; 84(24): 9238-9242.
2. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 - an Inducible Receptor for Neutrophils Related to Complement Regulatory Proteins and Lectins. *Science*. 1989; 243(4895): 1160-1165.
3. Lasky LA, Singer MS, Yednock TA, et al. Cloning of a Lymphocyte Homing Receptor Reveals a Lectin Domain. *Cell*. 1989; 56(6): 1045-1055.
4. Siegelman MH, Vanderijn M, Weissman IL. Mouse Lymph-Node Homing Receptor Cdna Clone Encodes a Glycoprotein Revealing Tandem Interaction Domains. *Science*. 1989; 243(4895): 1165-1172.
5. Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of Gmp-140, a Granule Membrane-Protein of Platelets and Endothelium - Sequence Similarity to Proteins Involved in Cell-Adhesion and Inflammation. *Cell*. 1989; 56(6): 1033-1044.
6. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al. Padgem Protein - a Receptor That Mediates the Interaction of Activated Platelets with Neutrophils and Monocytes. *Cell*. 1989; 59(2): 305-312.
7. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, et al. Selectins - a Family of Adhesion Receptors. *Cell*. 1991; 67(2): 233-233.
8. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconjugate Journal*. 1997; 14(5): 585-591.
9. Kogan TP, Revelle BM, Tapp S, Scott D, Beck PJ. A Single Amino-Acid Residue Can Determine the Ligand Specificity of E-Selectin. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(23): 14047-14055.
10. Chou KC. The Convergence-Divergence Duality in Lectin Domains of Selectin Family and Its Implications. *Febs Letters*. 1995; 363(1-2): 123-126.
11. Erbe DV, Watson SR, Presta LG, et al. P-Selectin and E-Selectin Use Common Sites for Carbohydrate Ligand Recognition and Cell-Adhesion. *Journal of Cell Biology*. 1993; 120(5): 1227-1235.
12. Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, et al. Insight into E-Selectin Ligand Interaction from the Crystal-Structure and Mutagenesis of the Lec Egf Domains. *Nature*. 1994; 367(6463): 532-538.

13. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*. 2000; 103(3): 467-479.
14. Patel KD, Nollert MU, McEver RP. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *Journal of Cell Biology*. 1995; 131(6): 1893-1902.
15. Erbe DV, Wolitzky BA, Presta LG, et al. Identification of an E-Selectin Region Critical for Carbohydrate Recognition and Cell-Adhesion. *Journal of Cell Biology*. 1992; 119(1): 215-227.
16. Li SH, Burns DK, Rumberger JM, et al. Consensus Repeat Domains of E-Selectin Enhance Ligand-Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(6): 4431-4437.
17. Mehta P, Patel KD, Laue TM, Erickson HP, McEver RP. Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes. *Blood*. 1997; 90(6): 2381-2389.
18. Dwir O, Kansas GS, Alon R. An activated L-selectin mutant with conserved equilibrium binding properties but enhanced ligand recognition under shear flow. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(25): 18682-18691.
19. Kansas GS, Saunders KB, Ley K, et al. A Role for the Epidermal Growth Factor-Like Domain of P-Selectin in Ligand Recognition and Cell-Adhesion. *Journal of Cell Biology*. 1994; 124(4): 609-618.
20. Tu LL, Chen AJ, Delahunty MD, et al. L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes - Interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity. *Journal of Immunology*. 1996; 157(9): 3995-4004.
21. Chen AJ, Engel P, Tedder TF. Structural Requirements Regulate Endoproteolytic Release of the L-Selectin (Cd62l) Adhesion Receptor from the Cell-Surface of Leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1995; 182(2): 519-530.
22. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The Selectins - Vascular Adhesion Molecules. *Faseb Journal*. 1995; 9(10): 866-873.
23. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2003; 9(6): 263-268.
24. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils Roll on E-Selectin. *Journal of Immunology*. 1993; 151(11): 6338-6346.
25. Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88(9): 3259-3287.
26. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent Fates of P-Selectins and E-Selectins after Their Expression on the Plasma-Membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 1993; 4(8): 791-801.

27. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, et al. Rapid Neutrophil Adhesion to Activated Endothelium Mediated by Gmp-140. *Nature*. 1990; 343(6260): 757-760.
28. Straley KS, Green SA. Rapid transport of internalized p-selectin to late endosomes and the TGN: Roles in regulating cell surface expression and recycling to secretory granules. *Journal of Cell Biology*. 2000; 151(1): 107-116.
29. Crocker PR, Feizi T. Carbohydrate recognition systems: Functional triads in cell-cell interactions. *Current Opinion in Structural Biology*. 1996; 6(5): 679-691.
30. Varki A. Selectin Ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(16): 7390-7397.
31. Varki A. Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 100(11): S31-S35.
32. Varki A. Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99(2): 158-162.
33. Poppe L, Brown GS, Philo JS, Nikrad PV, Shah BH. Conformation of sLe(x) tetrasaccharide, free in solution and bound to E-, P-, and L-selectin. *Journal of the American Chemical Society*. 1997; 119(7): 1727-1736.
34. Moore KL, Eaton SF, Lyons DE, Lichenstein HS, Cummings RD, McEver RP. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(37): 23318-23327.
35. Croce K, Freedman SJ, Furie BC, Furie B. Interaction between soluble P-selectin and soluble P-selectin glycoprotein ligand 1: equilibrium binding analysis. *Biochemistry*. 1998; 37(47): 16472-16480.
36. Moore KL, Varki A, McEver RP. Gmp-140 Binds to a Glycoprotein Receptor on Human Neutrophils - Evidence for a Lectin-Like Interaction. *Journal of Cell Biology*. 1991; 112(3): 491-499.
37. Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP. Structural and Functional-Characterization of Monomeric Soluble P-Selectin and Comparison with Membrane P-Selectin. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(20): 15229-15237.
38. Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*. 1995; 83(2): 333-343.
39. Bedard PW, Kaila N. Selectin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2010; 20(6): 781-793.
40. Springer TA. Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration. *Annual Review of Physiology*. 1995; 57: 827-872.
41. Alon R, Fuhlbrigge RC, Finger EB, Springer TA. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *Journal of Cell Biology*. 1996; 135(3): 849-865.
42. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism

that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 98(5): 1081-1087.

43. Bono MR, Elgueta R, Sauma D, et al. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2007; 18(1-2): 33-43.
44. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7(9): 678-689.
45. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996; 272(5258): 60-66.
46. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative Interactions of Lfa-1 and Mac-1 with Intercellular-Adhesion Molecule-1 in Facilitating Adherence and Transendothelial Migration of Human-Neutrophils In vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; 83(6): 2008-2017.
47. Muller WA, Weigl SA, Deng XH, Phillips DM. Pecam-1 Is Required for Transendothelial Migration of Leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1993; 178(2): 449-460.
48. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, et al. Pecam-1 (Cd31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Science*. 1990; 247(4947): 1219-1222.
49. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *Journal of Immunology*. 1999; 162(11): 6755-6762.
50. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2003; 9(6): 263-268.
51. Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Year in Human and Medical Genetics: Inborn Errors of Immunity Iii*. 2012; 1250: 50-55.
52. Kong LX, Luo C, Li XY, Zhou YD, He HX. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids in Health and Disease*. 2013; 12.
53. Furie B. P-selectin and blood coagulation - It's not only about inflammation any more. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2005; 25(5): 877-878.
54. Kuuliala A, Eberhardt K, Takala A, Kautiainen H, Repo H, Leirisalo-Repo M. Circulating soluble E-selectin in early rheumatoid arthritis: a prospective five year study. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61(3): 242-246.
55. Merten A, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift Fur Kardiologie*. 2004; 93(11): 855-+.
56. Kohler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*. 2010; 102(3): 602-609.
57. Fidler IJ. Tumor Heterogeneity and Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res*. 1978; 38(9): 2651-2660.

58. Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, et al. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(9): 3725-3730.
59. Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal*. 2008; 6: 10.
60. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13(12): 858-870.
61. Gebauer F, Wicklein D, Stubke K, et al. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp(--)/rag2(--) mice. *Gut*. 2013; 62(5): 741-750.
62. Wicklein D, Schmidt A, Labitzky V, Ullrich S, Valent P, Schumacher U. E- and P-Selectins Are Essential for Repopulation of Chronic Myelogenous and Chronic Eosinophilic Leukemias in a Scid Mouse Xenograft Model. *PLOS ONE*. 2013; 8(7).
63. Kohler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British Journal of Cancer*. 2010; 102(3): 602-609.
64. Lange T, Kupfernagel M, Wicklein D, et al. Aberrant Presentation of HPA-reactive Carbohydrates Implies Selectin-Independent Metastasis Formation in Human Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014.
65. Schwankhaus N, Gathmann C, Wicklein D, Riecken K, Schumacher U, Valentiner U. Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2014.
66. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International Journal of Cell Biology*. 2012; 2012: 676731.
67. Garcia-Criado FJ, Valdunciel-Garcia JJ, Garcia-Garcia J, et al. The sialyl Lewis X analogue, CY-1503, down-regulates leucocyte-endothelium interactions and the inflammatory response. *European Journal of Surgery*. 1999; 165(7): 690-697.
68. Kerr KM, Auger WR, Marsh JJ, et al. The use of cylexin (CY-1503) in prevention of reperfusion lung injury in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000; 162(1): 14-20.
69. Japp AG, Chelliah R, Tattersall L, et al. Effect of PSI-697, a novel P-selectin inhibitor, on platelet-monocyte aggregate formation in humans. *Journal of American Heart Association*. 2013; 2(1): e006007.
70. Chang J, Patton JT, Sarkar A, Ernst B, Magnani JL, Frenette PS. GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice. *Blood*. 2010; 116(10): 1779-1786.

71. Gutsaeva DR, Parkerson JB, Yerigenahally SD, et al. Inhibition of cell adhesion by anti-P-selectin aptamer: a new potential therapeutic agent for sickle cell disease. *Blood*. 2011; 117(2): 727-735.
72. Meyer C, Hahn U, Rentmeister A. Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *J Nucleic Acids*. 2011; 2011: 904750.
73. Ellington AD, Szostak JW. In vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature*. 1990; 346(6287): 818-822.
74. Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment - RNA Ligands to Bacteriophage-T4 DNA-Polymerase. *Science*. 1990; 249(4968): 505-510.
75. Robertson DL, Joyce GF. Selection In vitro of an RNA Enzyme That Specifically Cleaves Single-Stranded-DNA. *Nature*. 1990; 344(6265): 467-468.
76. Magbanua E, Zivkovic T, Hansen B, et al. d(GGGT)(4) and r(GGGU)(4) are both HIV-1 inhibitors and interleukin-6 receptor aptamers. *RNA Biol*. 2013; 10(2): 216-227.
77. Meyer C, Eydeler K, Magbanua E, et al. Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells. *RNA Biology*. 2012; 9(1): 67-80.
78. Berezhnoy A, Stewart CA, Mcnamara JO, et al. Isolation and Optimization of Murine IL-10 Receptor Blocking Oligonucleotide Aptamers Using High-throughput Sequencing. *Molecular Therapy*. 2012; 20(6): 1242-1250.
79. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors*. 2012; 12(1): 612-631.
80. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics (vol 9, pg 537, 2010). *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9(8).
81. Lee JH, Jucker F, Pardi A. Imino proton exchange rates imply an induced-fit binding mechanism for the VEGF165-targeting aptamer, Macugen. *Febs Letters*. 2008; 582(13): 1835-1839.
82. Rusconi CP, Scardino E, Layzer J, et al. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature*. 2002; 419(6902): 90-94.
83. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-&.
84. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13): 3406-3415.
85. Czerwinski JD, Mascotti DP. Quantitative non-isotopic nitrocellulose filter binding assays: Bacterial MnSOD-DNA interactions. *Biophysical Journal*. 2004; 86(1): 594a-594a.
86. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer Journal Clinicians*. 2013; 63(1): 11-30.
87. Carr I, Orr FW. Invasion and Metastasis. *Canadian Medical Association Journal*. 1983; 128(10): 1164-1167.

88. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. 2011; 147(2): 275-292.
89. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2011; 728(1-2): 23-34.
90. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91(2): 379-387.
91. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin Oligosaccharides Bind L-Selectin and P-Selectin and Inhibit Acute-Inflammation. *Blood*. 1993; 82(11): 3253-3258.
92. Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ. A Novel Sialyl Lewis(X) Analog Attenuates Neutrophil Accumulation and Myocardial Necrosis after Ischemia and Reperfusion. *Circulation*. 1994; 90(5): 2390-2401.
93. Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009; 8(8): 661-677.
94. Lin CL, Dumont AS, Calisaneller T, Kwan AL, Hwong SL, Lee KS. Monoclonal antibody against E selectin attenuates subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Surgical Neurology*. 2005; 64(3): 201-206.
95. Massaguer A, Engel P, Perez-del-Pulgar S, Bosch J, Pizcueta P. Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P). *Tissue Antigens*. 2000; 56(2): 117-128.
96. Han K, Liang ZQ, Zhou ND. Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors*. 2010; 10(5): 4541-4557.
97. Jenison RD, Jennings SD, Walker DW, Bargatze RF, Parma D. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. 1998; 8(4): 265-279.
98. Burnette AD, Nimjee SM, Batchvarova M, et al. RNA Aptamer Therapy for Vaso-Occlusion in Sickle Cell Disease. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2011; 21(4): 275-283.
99. Mann AP, Somasunderam A, Nieves-Alicea R, et al. Identification of Thioaptamer Ligand against E-Selectin: Potential Application for Inflamed Vasculature Targeting. *PLOS ONE*. 2010; 5(9).
100. Diaz JA, Lester PA, Kurz JC, et al. Evaluation of a Novel Anti-P-Selectin Aptamer ARC5690 On Venous Inflammation Following Acute Venous Thrombosis. *Blood*. 2009; 114(22): 1393-1393.
101. Meyer C, Berg K, Eydeler-Haeder K, et al. Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers. *RNA Biology*. 2013; 11(1).
102. Helwa R, Hoheisel JD. Analysis of DNA-protein interactions: from nitrocellulose filter binding assays to microarray studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 398(6): 2551-2561.

103. McCullum EO, Williams BAR, Zhang JL, Chaput JC. Random Mutagenesis by Error-Prone PCR. *In Vitro Mutagenesis Protocols, Third Edition*. 2010; 634: 103-109.
104. Huovinen T, Julin M, Sanmark H, Lamminmaki U. Enhanced error-prone RCA mutagenesis by concatemer resolution. *Plasmid*. 2011; 66(1): 47-51.
105. Lee SJ, Youn BS, Park JW, Niazi JH, Kim YS, Gu MB. ssDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes. *Analytical Chemistry*. 2008; 80(8): 2867-2873.
106. Susic A, Meneghello A, Cretaiu E, Gatto B. Human Thrombin Detection Through a Sandwich Aptamer Microarray: Interaction Analysis in Solution and in Solid Phase. *Sensors*. 2011; 11(10): 9426-9441.
107. Larsen GR, Sako D, Ahern TJ, et al. P-Selectin and E-Selectin - Distinct but Overlapping Leukocyte Ligand Specificities. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(16): 11104-11110.
108. Lasky LA. Lectin Cell-Adhesion Molecules (Lec-Cams) - a New Family of Cell-Adhesion Proteins Involved with Inflammation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1991; 45(2): 139-146.
109. Revelle BM, Scott D, Kogan TP, Zheng JH, Beck PJ. Structure-function analysis of P-selectin-sialyl Lewis(x) binding interactions - Mutagenic alteration of ligand binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(8): 4289-4297.
110. Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(6): 1713-1725.
111. Mergny JL, Lacroix L. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*. 2003; 13(6): 515-537.
112. Woody RW. Circular-Dichroism. *Biochemical Spectroscopy*. 1995; 246: 34-71.
113. von Kockritz-Blickwede M, Chow OA, Nizet V. Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. *Blood*. 2009; 114(25): 5245-5246.
114. Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B. Modified Deoxyoligonucleotides Stable to Exonuclease Degradation in Serum. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(4): 747-750.
115. Takahashi M, Minakawa N, Matsuda A. Synthesis and characterization of 2'-modified-4-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(4): 1353-1362.
116. Meyer C, Berg K, Eydeler-Haeder K, et al. Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers. *RNA Biology*. 2014; 11(1): 57-65.
117. Kaur H, Yung LY. Probing high affinity sequences of DNA aptamer against VEGF165. *PLOS ONE*. 2012; 7(2): e31196.
118. Kaur H, Li JJ, Bay BH, Yung LY. Investigating the antiproliferative activity of high affinity DNA aptamer on cancer cells. *PLOS ONE*. 2013; 8(1): e50964.

119. Machiels JP, Kaminsky MC, Keller U, et al. Phase Ib trial of the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055 in combination with 5-fluorouracil, cisplatin, and cetuximab as first-line palliative treatment in patients with recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Investigational New Drugs*. 2013; 31(5): 1207-1216.
120. Kaur H, Li JJ, Bay BH, Yung LYL. Investigating the antiproliferative activity of high affinity DNA aptamer on cancer cells. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: S163-S163.
121. Ott J, Eckstein F. Protection of Oligonucleotide Primers against Degradation by DNA-Polymerase-I. *Biochemistry*. 1987; 26(25): 8237-8241.
122. Labelle M, Hynes RO. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discovery*. 2012; 2(12): 1091-1099.
123. Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A, et al. Selectin Ligand Sialyl-Lewis x Antigen Drives Metastasis of Hormone-Dependent Breast Cancers. *Cancer Res*. 2011; 71(24): 7683-7693.
124. Shiozaki K, Yamaguchi K, Takahashi K, Moriya S, Miyagi T. Regulation of sialyl Lewis antigen expression in colon cancer cells by sialidase NEU4. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(24): 21052-21061.
125. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological Reviews*. 1999; 79(1): 181-213.
126. Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL. Lymphocyte Adherence to High Endothelial Venules - Characterization of a Modified Invitro Assay, and Examination of the Binding of Syngeneic and Allogeneic Lymphocyte Populations. *Journal of Immunology*. 1979; 123(5): 1996-2003.
127. Stamper HB, Woodruff JJ. Lymphocyte Homing into Lymph-Nodes - Invitro Demonstration of Selective Affinity of Recirculating Lymphocytes for High-Endothelial Venules. *Journal of Experimental Medicine*. 1976; 144(3): 828-833.
128. Marchesi VT, Gowans JL. Migration of Lymphocytes through Endothelium of Venules in Lymph Nodes - Electron Microscope Study. *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*. 1964; 159(975): 283-+.
129. Winer-Jones JP, Vahidi B, Arquilevich N, et al. Circulating Tumor Cells: Clinically Relevant Molecular Access Based on a Novel CTC Flow Cell. *PLOS ONE*. 2014; 9(1): e86717.
130. Richter U, Schroder C, Wicklein D, et al. Adhesion of small cell lung cancer cells to E- and P-selectin under physiological flow conditions: implications for metastasis formation. *Histochem Cell Biol*. 2011; 135(5): 499-512.
131. Kogan TP, Dupre B, Bui H, et al. Novel synthetic inhibitors of selectin-mediated cell adhesion: Synthesis of 1,6-bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2-alpha-D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC1269). *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998; 41(7): 1099-1111.

PATENT

Beide während des Zeitraums der Promotion selektierten Aptamere wurden zum Patent angemeldet (Dokumenten Referenz-Nr. 2013112212485800DE)

PUBLIKATIONEN

Faryammanesh R, Lange T, Magbanua E, et al. SDA, a DNA Aptamer Inhibiting E- and P-Selectin Mediated Adhesion of Cancer and Leukemia Cells, the First and Pivotal Step in Transendothelial Migration during Metastasis Formation. *PLOS ONE*. 2014; 9(4): e93173.

VORTRÄGE/PREISE

Posterpräsentation auf der 9. Hamburger Studententagung: Preis für die beste Posterbeteiligung

ANHANG

Tabelle 31: Gefahrenpiktogramme laut GHS-Verordnung

Piktogramm	Bezeichnung	Signalwort	Gefahrenklasse
	Ätzwirkung	Gefahr	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	Dickes Ausrufezeichensymbol	-	-
	Explodierende Bombe	Gefahr	Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	Flamme	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	Flamme über einem Kreis	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	Gasflasche	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	Gesundheitsgefahr	Gefahr	Diverse Gesundheitsgefahren
	Totenkopf mit gekreuzten Knochen	Gefahr	Akute Toxizität
	Umwelt	Achtung/ Gefahr	Gewässergefährdend

Tabelle 32: Verwendete Chemikalien mit den entsprechenden Gefahrstoffinformationen

Gefahrstoff	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	 	H302+H312- H315-H317-H319- H340-H350- H361f-H372	P260-P280-P321- P305+P351+P338-P405-P501
Ammoniumperoxo- disulfat	  	H272-H302-H315- H317-H319-H334- H335	P260-P280- P305+P351+P338
Ampicillin- Natriumsalz	 	H317-H334	P261-P280-P302+P352- P342+P311
Essigsäure		H290-H314	P260-P280-P301+P330+P331- P303+P361+P353- P305+P351+P338-P310
Ethanol		H225	P210-P233
Ethidiumbromid	 	H302-H330-H341	P281-P301+P312-P304+P340- P310-P405
Isopropanol	 	H225-H319-H336	P210-P280-P305+P351+ P338

Gefahrstoff	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Natriumdodecylsulfat	  	H228- H302+H332- H315-H318-H335- H412	P210-P280-P302+P352- P304+P340-P305+P351+P338- P314
Natriumhydroxid		H290-H314	P280-P303+P361+P353- P301+P330+P331- P305+P351+P338-P310-P406
Tetramethylethylen-diamin	  	H225-H302-H332- H314	P210-P280-P303+P361+P353- P301+P330+P331- P305+P351+P338+P310
Tris		H315-H319-H335	P280-P302+P352- P305+P351+P338
β-Mercaptoethanol	  	H301-H310-H330- H315-H318-H410	P280-P273-P302+P352- P304+P340-P305+P351+P338- P310

Tabelle 33: Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe

CAS- Nummer	Substanz	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	30-40%-ige, wässrige Lösungen zur Polymerisation: 300 mL	K1B, M1B, RF2
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/mL wässrige Lösungen zur Färbung von Polyacrylamidgelen (0,5 mg/mL End-konzentration): 150 µL	M2
56-65-5	Adenosintriphosphat	Radioaktives Isotop (³² P) zur radioaktiven Markierung von Nucleinsäuren Menge: 100 µL	
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	BCIP-Lösung	RE1B

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Ulrich Hahn danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas, seine Betreuung, sein Vertrauen, seine Geduld und das angenehme Arbeitsverhältnis.

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Udo Schumacher, JProf. Tobias Lange und Dr. Daniel Wicklein danke ich für die Zusammenarbeit, die hilfreichen Ratschläge sowie die Möglichkeit, in ihren Laboren die Fluss-Assays durchführen zu dürfen.

Der Fazit-Stiftung danke ich für die Finanzierung innerhalb der ersten zwei Jahre meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Cindy Meyer gilt mein besonderer Dank. Ihre positive Art und Hilfestellungen, gerade am Anfang meiner Arbeit, haben mir sehr viel Kraft gegeben.

Dr. Eileen Magbanua und Dr. Sina Haas danke ich für ihre hilfreichen Ratschläge, ihr ständiges Dasein und die Zusammenarbeit am gemeinsamen Paper. Ebenfalls danke ich Dr. Sina Haas sowie Katharina Berg und Katrin Seelhorst für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit. Zusätzlich danke ich Katharina Berg sowie Katrin Seelhorst für ihre Geduld mit mir in den stressigen Zeiten, ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft. Für das Gefühl, nicht ganz alleine dazustehen, danke ich allen Vieren.

Frau Elena Wasiljew und Frau Margot Binnewies danke ich für die Einführung in die Labore. Meinen Praktikanten und BTA-Schülern danke ich ebenfalls für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor. Daniela Otto danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Bereichen.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, für die kollegiale und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Den übrigen Kollegen aus der gesamten BC danke ich für ein gutes Arbeitsklima in den letzten Jahren.

Meiner Mutter gilt mein ewiger Dank. Ohne sie hätte ich es in meinem Leben nie soweit geschafft. Alles was ich bin, bin ich dank ihr. Auch meinen Brüdern Reza und Pouriya gilt mein Dank, deren Liebe mir immer Kraft gegeben hat.

Meinen Schwiegereltern und meinem Schwager Navid Alagheband danke ich ebenfalls. Ihre Liebe und ihr Glauben an mich hat mir stets Kraft und Motivation gegeben. Navid danke ich zusätzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei meinem Mann Nima Alagheband möchte ich mich ganz herzlich für seine Liebe, Unterstützung und grenzenlose Geduld bedanken. Ohne den Freiraum, den er mir gegeben hat, hätte ich meine Doktorarbeit nicht so schnell und unkompliziert anfertigen können. Seiner Liebe verdanke ich die Kraft, die ich für harte Zeiten gebraucht habe. Das Gefühl, bedingungslos geliebt zu werden, hat mir die Promotion sehr erleichtert.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Doktorarbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur sowie Hilfsmitteln angefertigt worden ist. Alle eingebrachten Ergebnisse stammen von mir oder sind entsprechend gekennzeichnet. Ich versichere zusätzlich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch nie einer anderen Prüfungsstelle zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde. Zudem wurden keine vorhergehenden Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Hamburg, April 2014

Rassa Faryammanesh

LEBENS LAUF



Rassa Faryammanesh

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Geboren	19.09.1981 Teheran, Iran
Nationalität	deutsch
Adresse	Suhrenkamp 16 22335 Hamburg
Kontakt	rassa.faryammanesh@gmail.com +4917662612945

AUSBILDUNG

10.2010 - 05.2014	Doktorarbeit an der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Hahn, Institut für Biochemie und Molekularbiologie Thema: <i>Selektion und Charakterisierung Selektin-spezifischer DNA-Aptamere</i>
10.2009 - 06.2010	Diplomarbeit an der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. S. Förster Thema: <i>Polymerbeschichtung von Nanopartikeln und Einkapselung von hydrophoben und hydrophilen Nanopartikeln in vesikelbildende PI-PEO-Blockcopolymeren</i> Diplom Note: Sehr gut
04.2005 - 09.2009	Studiengang Chemie an der Universität Hamburg
2000 - 2003	Meinert Johannsen Schule (Wirtschaftsabitur)
1998 - 2000	Meinert Johannsen Schule (Realschulabschluss)

AUSZEICHNUNGEN,
STIPENDIEN

Posterpräsentation auf der 9. Hamburger Studententagung: Preis für die beste Posterbeteiligung.
Promotionsstipendiatin der Fazit-Stiftung (2010-2012)

KOMPETENZEN

Persönlich

Zielstrebigkeit, Führungskompetenz, Teamfähigkeit, Organisationsfähigkeit, Verantwortungsbewusstsein

Fachlich

Kultivierung eukaryotischer Suspensions- und Adhäsionszelllinien; Proliferationsstudien; SELEX-Prozess; FACS-Studien; Proteinanalyse; Präparation, Trennung, Reinigung und Modifikation von Nukleinsäuren; Klonierungsmethoden; radioaktive Arbeitsmethoden; Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie; laminar flow cytometry; Zirkulardichroismus-Spektroskopie; Fluoreszenzpolarisationspektroskopie, Polymer-Vesikel-Präparation, Einkapselung von hydrophoben und hydrophilen Nanopartikeln, Beschichtung von Nanopartikeln, Mikroskopie, Thermogravimetrie, Gelpermeationschromatographie, Dynamische Lichtstreuung,

EDV

MS-Office (Word, Excel, Powerpoint), OriginPro, GraphPad Prism, ChemDraw, EditSeq, MegAlign

Sprachen

Deutsch, Englisch, Persisch

BERUFSERFAHRUNG

2010 - 2012

Dolmetscherin/Übersetzerin bei der Innenbehörde in Hamburg

2003 - 2005

Verkäuferin bei Nike, Hamburg

2001 - 2003

Tätig im Industriemuseum Elmshorn

SONSTIGES

Bestandene Eignungsprüfung der Offizier-Prüferzentrale in Köln

Ehemaliges Mitglied des Internationalen Jugendprogramms

Hamburg, April 2014

Rassa

Faryammanesh

