

Systematische Evolution von DNA-Aptameren zur Charakterisierung und Diagnostik von pathologisch veränderten Endothelzellen in Tumoren und entzündlichen Regionen des Rattenhirns

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Michael Blank

Tag der mündlichen Prüfung:	01.08.2002
Dekan:	Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schlüsener
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schott
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Volkers
4. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Scheller

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pathologisch veränderte Endothelzellen während der Tumorangiogenese	2
1.2	Pathologisch veränderte Endothelzellen in entzündlichen Hirnregionen	3
1.3	Erzeugung von Liganden gegen aktiviertes Endothel der Blut-Hirnschranke.....	4
2	SELEX – EINE METHODE DER KOMBINATORISCHEN CHEMIE	7
2.1	Der SELEX-Prozess	8
2.1.1	Der DNA-SELEX Prozess.....	9
2.1.2	Der RNA-SELEX-Prozess	11
2.1.3	Anreicherungskontrolle	11
2.1.4	Charakterisierung von Zielstruktur-bindenden Aptameren	12
3	APTAMERE IN DER DIAGNOSTIK	15
3.1	Aptamer- vs. Antikörpertechnologie.....	15
3.2	Aptamere in Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	18
3.3	Aptamere in der Durchflusszytometrie	18
3.4	Aptamere in der Biosensorik.....	19
3.5	Aptamere zur Detektion von immobilisierten Proteinen („Eastern Blotting“)	20
3.6	Aptamerarrays zur Proteomanalyse.....	20
4	SELEKTION VON APTAMEREN GEGEN KOMPLEXE ZIELSTRUKTUREN..	22
4.1	Systematische Evolution von DNA-Aptameren gegen die pathologische Blut-Hirnschranke	22
4.2	Wahl der Zielstruktur – der Einsatz von Endothelzellkulturen als komplexe Zielstruktur	23
4.3	Wahl der Nukleinsäurebibliothek – RNA- oder DNA-SELEX.....	24
4.4	Selektionsbedingungen.....	26
4.4.1	Selektion unter physiologischen Bedingungen.....	26
4.4.2	Behandlung der zellulären Zielstrukturen	26
5	REDUKTION DER KOSELEKTION IRRELEVANTER NUKLEINSÄUREN	27
5.1	Reduktion der Hintergrundbindung	27

5.2	Reduktion von Separationsmatrix-bindenden Aptameren.....	28
5.3	Reduktion von endothelzell-unspezifischen Aptameren	29
6	SYSTEMATISCHE EVOLUTION VON APTAMEREN ZUR DIAGNOSE PATHOLOGISCHER MIKROVASKULATUR	30
6.1	Die Selektionsprozedur in der Übersicht.....	30
6.2	Die erste Selektionsrunde.....	31
6.2.1	Vorbereitung der Bibliothek und Gegenselektion	31
6.2.2	Herstellung fluoreszenzmarkierter Aptamerbibliotheken	32
6.3	Zweite bis siebte Selektionsrunde	34
6.4	Sortierung in einzelne Klone	35
6.5	Dekonvolution-SELEX.....	36
6.5.1	Dekonvolution-SELEX (Schritt 1) – durchflusszytometrische Evaluierung der Endothelzell-Bindung individueller ssDNA-Polynukleotide	37
6.5.2	Dekonvolution-SELEX (Schritt 2) – histologische Evaluierung der Endothelzelselektivität individueller Aptamere auf Gewebeschnitten.....	38
6.5.2.1	Evaluierung der Aptamerselektivität gegen die aktivierte Mikrovaskulatur im C6-Glioblastom des Rattenhirns.....	38
6.5.2.2	Evaluierung der Aptamerselektivität gegen die aktivierte Mikrovaskulatur in entzündlichen Regionen des Rattenhirns.....	43
7	CHARAKTERISIERUNG VON APTAMER III.1	46
7.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Bindung von Aptamer III.1	46
7.1.1	Ermittlung der Endothelzellspezifität.....	46
7.1.2	Endothelzellstimulation mit H ₂ O ₂	46
7.2	Gewebe- und Zellkulturhistologie.....	48
7.2.1	Histologische Doppelfärbung mit Aptamer III.1	48
7.2.2	Verwunden einer konfluenten Endothelzellschicht.....	49
7.3	Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1	51
7.4	Das endotheliale Regulatorprotein Pigpen.....	55
8	ZUSAMMENFASSUNG	57
8.1	Der SELEX-Prozess	59
8.2	Charakterisierung von Aptamer III.1	61
8.2.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellbindung von Aptamer III.1 ..	61
8.2.2	Histologische Charakterisierung der Gewebefindung von Aptamer III.1	62
8.1.3	Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1	63

EXPERIMENTELLER TEIL

1	ALLGEMEINE METHODEN	65
1.1	Zelllinien und Zellkulturbedingungen.....	65
1.2	Puffer und Lösungen	66
1.3	SELEX-Bibliothek und Oligonukleotide.....	66
1.4	Polymerase-Kettenreaktion	67
1.5	Dynabeads® vermittelte Darstellung von ssDNA-Aptameren durch Doppelstrangtrennung	68
1.6	Plasmid-Präparation	68
1.7	Restriktionsanalyse.....	69
1.8	Präparation von Gewebeschnitten	69
1.8.1	C6-Glioblastom-Modell der Ratte	69
1.8.2	EAE-Modell der Ratte	69
1.9	SELEX – Selektion von ssDNA gegen YPEN-1-Endothelzellen	70
1.9.1	Erste Selektionsrunde	70
1.9.2	Zweite bis siebte Selektionsrunde	71
1.9.3	Achte Selektionsrunde.....	71
1.9.4	Bereitstellung individueller FITC-18C-markierter Aptamere aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde	71
1.10	Dekonvolution-SELEX (erster Schritt): Durchflusszytometrische Analyse individueller Aptamere	72
1.11	Dekonvolution-SELEX (zweiter Schritt): Histologische Analyse individueller Aptamere auf Gewebeschnitten	72
2	CHARAKTERISIERUNG VON APTAMER III.1	73
2.1.	Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.....	73
2.2	Doppelmarkierung von Endothelzellen mit CD-31	73
2.3	Verletzen einer konfluenten Endothelzellschicht	73
2.4	H ₂ O ₂ -Stimulation einer konfluenten YPEN-1-Endothelzellkultur	74
2.5	Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1	74
2.5.1	Beschichtung von Dynabeads® mit Aptamer III.1	74
2.5.2	Herstellung von YPEN-1-Endothelzelllysat.....	74
2.5.3	Isolierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1	75
2.5.4	Massenspektrometrische Charakterisierung des isolierten Proteins.....	75

3	DATEN INDIVIDUELLER FITC-18C-MARKIERTER APTAMERE	77
3.1	Die aktivierte Mikrovaskulatur der pathologischen BHS bindende Aptamere ...	77
3.1.1	Aptamer III. 1	78
3.1.2	Aptamer I/II. 109	79
3.1.3	Aptamer I/II. 112	80
3.1.4	Aptamer I/II. 115	81
3.1.5	Aptamer III. 8	82
3.1.6	Aptamer III. 9	83
3.1.7	Aptamer III. 19	84
3.1.8	Aptamer III. 20	85
3.1.9	Aptamer III. 21	86
3.1.10	Aptamer III. 22	87
3.1.11	Aptamer III. 25	88
3.1.12	Aptamer III. 17	89
3.1.13	Aptamer III. 11	90
3.1.14	Aptamer I/II. 124	91
3.1.15	Aptamer I/II. 120	92
3.1.16	Aptamer I/II. 119	93
3.1.17	Aptamer I/II. 45	94
3.1.18	Aptamer I/II. 30	95
3.1.19	Aptamer I/II. 17	96
3.1.20	Aptamer I/II. 8	97
3.1.21	Aptamer I/II. 6	98
3.2	Unspezifische Aptamere.....	99
	LITERATURVERZEICHNIS	102

Abkürzungsverzeichnis

BHS	Blut-Hirnschranke
BSA	Rinderserum (bovine serum albumin)
bFGF	basic fibroblast growth factor
CD-4	Differenzierungsantigen-4 (cluster determinant-4)
18C	18-Kohlenstoff-Platzhalter
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EZ	Endothelzelle(n)
E. coli	Escherichia coli Bakterien
EWS	Ewing sarcoma
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FCS	Kälberserum (fetal calf serum)
HIV	human immunodeficiency virus
HNE	human neutrophil elastase
hTSH	human thyroid stimulating hormon
ICAM-1	intracellular cell adhesion molecule –1
kDa	Kilodalton
MS	Multiple Sklerose
mAb	Monoklonaler Antikörper
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleinsäure-Schneideenzym
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
trB	dreifacher Biotinrest
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die Blut-Hirnschranke (BHS) ist eine dichte zelluläre Barriere, die aus einer Endothelzellschicht und Astrozyten Fußfortsätzen besteht. Im gesunden Gehirn erlaubt die BHS nur kleinen organischen Molekülen (z.B. Glukose, best. Aminosäuren) und einer begrenzten Anzahl von spezifisch transzytosierbaren Makromolekülen (z.B. Transferin) die Passage ins Zentralnervensystem (ZNS) (1). Diese selektive Permeabilität ist von besonderem klinischen Interesse, da sie die empfindliche und leicht verletzbare Umgebung des Gehirns schützt (2). Die BHS ist bei zahlreichen Erkrankungen des ZNS massiv kompromittiert, u.a. in Glioblastom-Hirntumoren^[*] (3) und bei Multiple Sklerose (MS) ^[v], einer entzündlichen Erkrankung des ZNS (4). Für beide Erkrankungen gibt es standardisierte Tiermodelle: das C6-Glioblastom für Glioblastom-Hirntumoren (5), bzw. die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) für MS (6).

Bei der Behandlung und Diagnostik von Tumoren des ZNS stellt die BHS eine nur schwer zu überwindende Barriere dar: Die kontinuierliche Endothelzellschicht der tumorversorgenden Blutgefäße erschwert die Zugänglichkeit des Tumorgewebes sowohl für Therapeutika als auch für bildgebende Diagnostika (7, 8). Deswegen richten sich alternative Ansätze zur Diagnose und Therapie von Hirntumoren (aber auch von anderen soliden Tumoren im gesamten Körper) nicht gegen die Tumorzellen selbst, sondern gegen die Endothelzellen der neugebildeten, den Tumor mit Nährstoffen versorgenden Mikrogefäße (9). Für Glioblastome besonders markant sind die glomeruloiden Endothelzell-Proliferate in den Tumorrandbereichen an der Grenze zum „Normalhirn“. Eine Methode, die ihre sensitive Visualisierung ermöglicht, hat großes Potenzial, die Grenze zwischen Tumor- und Normalgewebe deutlich zu machen und dadurch eine komplettere operative Entfernung des Hirntumors zu ermöglichen. Die rezidivfreie Überlebenszeit von Patienten mit schnell wachsendem Glioblastom-Hirntumor könnte dadurch erheblich verlängert werden (10).

[*] Das Glioblastom ist neben dem Meningiom der am meisten verbreitete Tumor des ZNS. Er ist hoch maligne und zeichnet sich durch ein rasches Wachstum aus. Klinisch manifestiert sich ein Glioblastom durch Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes, Sehstörungen, Übelkeit und neurologisch fokalen Symptomen. Die Prognose für betroffene Patienten ist sehr schlecht: Die mittlere Überlebensdauer liegt unter einem Jahr.

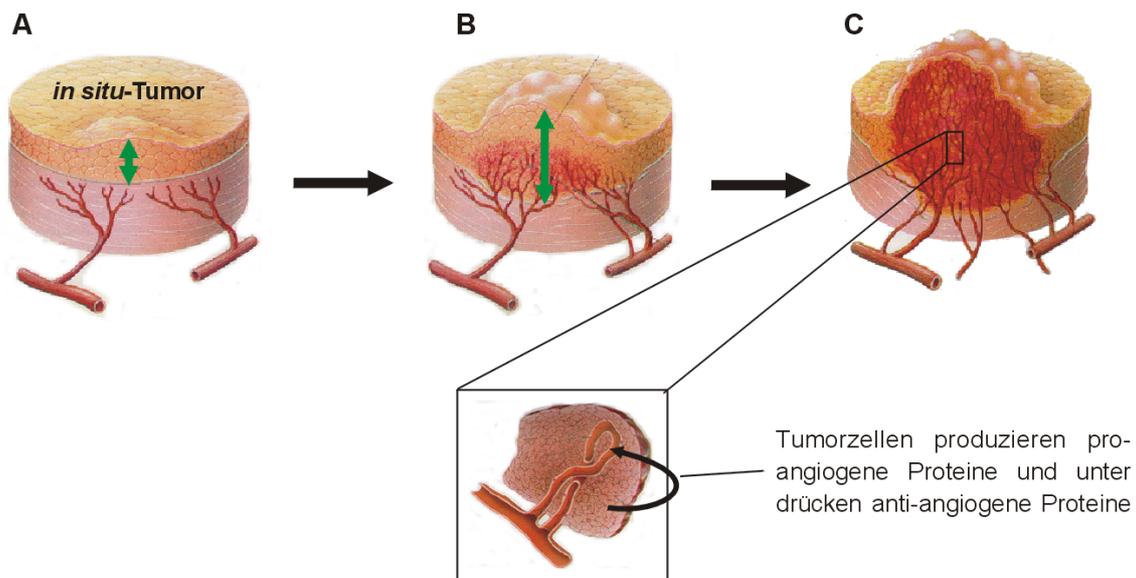
[v] MS ist eine der häufigsten entzündlichen Erkrankungen des ZNS. Entzündungsherde in der nervenfaser-isolierenden Myelinschicht führen zu ihrer Entmarkung und Informationen können nicht mehr weitergeleitet werden. Es kommt zu den für MS charakteristischen neurologischen Defiziten wie Optikus (Sehstörung), Dysarthrie (neurologische Störung der Sprechmuskulatur), Demenz (fortschreitender hirnorganisch bedingter Abbau der intellektuellen Leistungsfähigkeit) und Dysmetrie (Koordinations- bzw. ataktische Störung).

Im Gegensatz zur weitgehend undurchlässigen BHS im gesunden Gehirn, bzw. in Tumoren zeichnet sich die BHS in entzündlichen Hirnregionen der MS bzw. EAE durch eine erhöhte Permeabilität für Zellen und andere Bestandteile des Blutes aus. Diese Gewebeeinfiltrate tragen dazu bei, dass sich das Krankheitsbild kontinuierlich verschlechtert (11). Der Verlust der natürlichen BHS-Schutzfunktion ist einer der ersten pathologischen Prozesse bei entzündlichen Hirnerkrankungen, noch lange bevor neurologische Störungen auftreten. Die Erkennung der veränderten, pathologischen Blutgefäße in entzündlichen Hirnregionen hätte somit das Potenzial MS bzw. EAE in einem frühen Stadium diagnostizieren und somit rechtzeitig behandeln zu können (in späteren Stadien sind diese Erkrankungen nicht mehr therapierbar) (12).

Trotz der Unterschiede in ihrer Permeabilität weisen BHS-bildende Endothelzellen in Tumoren und entzündlichen Regionen des pathologischen Gehirns eine entscheidende Gemeinsamkeit auf: Im Gegensatz zum ruhenden Endothel im gesunden Gehirn sind sie aktiviert (13, 14). Endothelzellen werden von Faktoren des pathologischen Gewebes aktiviert, um (i) sie zu veranlassen, sich zu teilen und zu organisieren, um neue Blutgefäße zu bilden (15) bzw. (ii) um die Anlagerung und Passage von entzündungsfördernden Zellen aus dem Blut ins leicht verletzliche ZNS zu ermöglichen (16). Beide Typen von Aktivierung weisen sich durch einen veränderten endothelialen Phänotyp aus: Die Endothelzellen produzieren bestimmte Proteine als Antwort auf die veränderten Bedingungen des pathologischen Gehirns. Diese Proteine können demzufolge als endotheliale Adressen betrachtet werden, durch die sich aktivierte Gefäße von den ruhenden Gefäßen im gesunden Körper unterscheiden.

1.1 Pathologisch veränderte Endothelzellen während der Tumorangiogenese

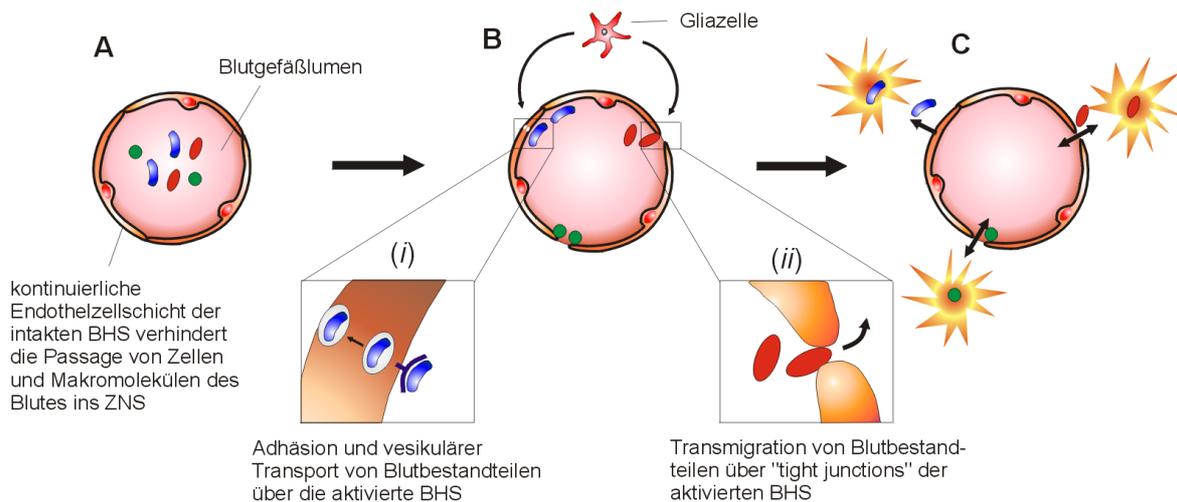
Vom Tumor produzierte Faktoren leiten einen irreversiblen und unkontrollierten – als Tumorangiogenese bezeichneten – Prozess ein, der dafür sorgt, dass das Wachstum von Tumormikrogefäßen kontinuierlich vorangetrieben wird (Schema 1). Nur durch eine Neubildung von Blutgefäßen kann der wachsende Nährstoffbedarf des Tumors gewährleistet werden und somit sein Wachstum voranschreiten (17, 18). Die Endothelzellen wechseln dabei von einem ruhenden in einen aktivierten Phänotyp (19, 20). Dieser zeichnet sich durch übermäßige Expression von pro-angiogenen Proteinen aus – molekulare Adressen, die somit zur Diagnostik und Therapie solider Tumore herangezogen werden können (21). Für die Endothelzell-Proliferation benötigte, differenziell exprimierte Proteine sind beispielsweise VEGF-Rezeptoren (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors) oder das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.



Schema 1. Tumorangiogenese. **A,** Tumorzellen in ausreichendem Abstand (2–3 mm) zu Blutgefäßen, die seine Nährstoffversorgung gewährleisten. **B,** Mit zunehmender Ausdehnung des Tumors reicht das bereits existierende Gefäßsystem nicht mehr aus, um seinen steigenden Nährstoffbedarf zu decken. **C,** Der Tumor beginnt, Endothelzellen zu rekrutieren, indem er sie dazu veranlasst, ein neues Gefäßsystem zu bilden, um den steigenden Nährstoffbedarf des wachsenden Tumors zu gewährleisten.

1.2 Pathologisch veränderte Endothelzellen in entzündlichen Hirnregionen

Die Entstehung von MS ist bislang unbekannt. Sowohl virale Infektion, genetische Veranlagung, die Rolle von Umweltfaktoren oder Autoimmunität werden diesbezüglich diskutiert (22, 23). Unabhängig von seiner Entstehung ist jedoch bekannt, dass der Verlauf der Krankheit mit einer Entzündungsreaktion des Gehirns assoziiert ist, bei der vor allem die Gliazellen des ZNS Signale abgeben, welche die Endothelzellen der BHS dazu veranlassen, die Adhäsion und Transmigration von aktivierten T-Lymphozyten (und anderen entzündungsfördernden Blutbestandteilen) über die BHS in das empfindliche ZNS zu ermöglichen. Diese Infiltrate induzieren weitere Entzündungsreaktionen und sorgen somit für eine Verschlechterung des Krankheitsbildes. Eine derart aktivierte (da durchlässige) Endothelzellschicht in Gefäßen entzündlicher Hirnregionen produziert für die Entzündungsreaktion charakteristische Adhäsionsproteine: Das „Vascular Cell Adhesion Molecule-1“ (VCAM-1) und das „Intracellular Adhesion Molecule-1“ (ICAM-1) sind beispielsweise solche molekulare Adressen, durch die sich aktivierte Endothelzellen in der MS bzw. EAE von gesunden, ruhenden Endothelzellen der gesunden BHS unterscheiden (24).



Schema 2. Aktivierung der BHS in Entzündungsreaktionen des Gehirns. **A**, Die kontinuierliche Endothelzell-Schicht im gesunden Hirn verhindert die Passage von Zellen und Makromolekülen des Blutes ins empfindliche ZNS. **B**, In entzündlichen Hirnregionen induzieren von Gliazellen produzierte Faktoren die Ausbildung von (i) BHS-ständigen Adhäsionsmolekülen und (ii) sog. „tight junctions“ und ermöglichen dadurch die Adhäsion und Transmigration von entzündungsfördernden Blutbestandteilen ins ZNS. **C**, Im ZNS induzieren diese Infiltrate weitere Entzündungsreaktionen und sorgen somit für die Verschlechterung des Krankheitsbildes.

1.3 Erzeugung von Liganden gegen aktiviertes Endothel der Blut-Hirnschranke

Die pathologisch veränderte Endothelzelle konnte bislang nicht ausreichend genug untersucht werden und die Mechanismen, die den Übergang vom ruhenden zum aktivierten endothelialen Phänotyp steuern, sind noch nicht gänzlich verstanden. Eine Vielfalt an Faktoren und Rezeptoren sind an diesem Vorgang beteiligt und ihre Rolle in der jeweiligen Aktivierungskaskade nur schwer zu ermitteln. Abhängig von ihrer Konzentration, von ihrem Zustand und von der Anwesenheit anderer Faktoren können einige Proteine mehrere, sogar antagonistische Funktionen innehaben. Es muss angenommen werden, dass viele solcher Adressen existieren – Proteine, die bislang unentdeckt oder deren Relevanz im komplexen Netzwerk von angiogenen Prozessen in Tumoren bzw. entzündlichen Prozessen des ZNS noch unbekannt sind (19, 25). Da ihre Funktion aber immer im Kontext möglichst vieler pathologie-assoziiierter Faktoren betrachtet werden muss, ist das Auffinden von bisher unbekanntem Regulatoren der Endothelzell-Aktivierung primäres Ziel der Tumorangio- und MS-Forschung. Es sind nur wenige Zielstrukturen der aktivierten BHS bekannt – Angriffspunkte für Diagnostika und Therapeutika somit begrenzt (3).

Zur Herstellung von Liganden gegen molekulare Adressen des aktivierten Endothels eignen sich Methoden der kombinatorischen Chemie (26, 27). Ihre Bibliotheken werden nicht durch natürliche Selektionsmechanismen wie Immuntoleranz beeinflusst und können somit als Quelle von Liganden herangezogen werden, die im Gegensatz zu Antikörpern auch gegen

nicht immunogene Zielstrukturen gerichtet sein können (28). So konnten mittels kombinatorischer Methoden, wie beispielsweise „Phagen Display“, bereits Peptidliganden entwickelt werden, die Tumorgefäße zu identifizieren vermochten (29, 30). Um als spezifisch bindender Ligand für ein bestimmtes Zielmolekül fungieren zu können, müssen Peptide zum Zwecke ihrer Stabilisierung jedoch dimerisiert oder im Kontext größerer Strukturen (z.B. Phagen oder Liposomen) präsentiert werden. Die daraus resultierenden sterischen Einschränkungen limitieren jedoch die Anzahl an potenziellen Liganden, die in einem kombinatorisch-chemischen Experiment getestet werden können (31).

Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) ist eine auf Nucleinsäuren basierende kombinatorisch-chemische Methode, welche die Herstellung von sterisch weniger anspruchsvollen Polynukleotidliganden ermöglicht. In Analogie zu Antikörpern sind diese Polynukleotidliganden in der Lage, Zielstrukturen mit hoher Selektivität zu erkennen und mit hoher Affinität zu binden (32).

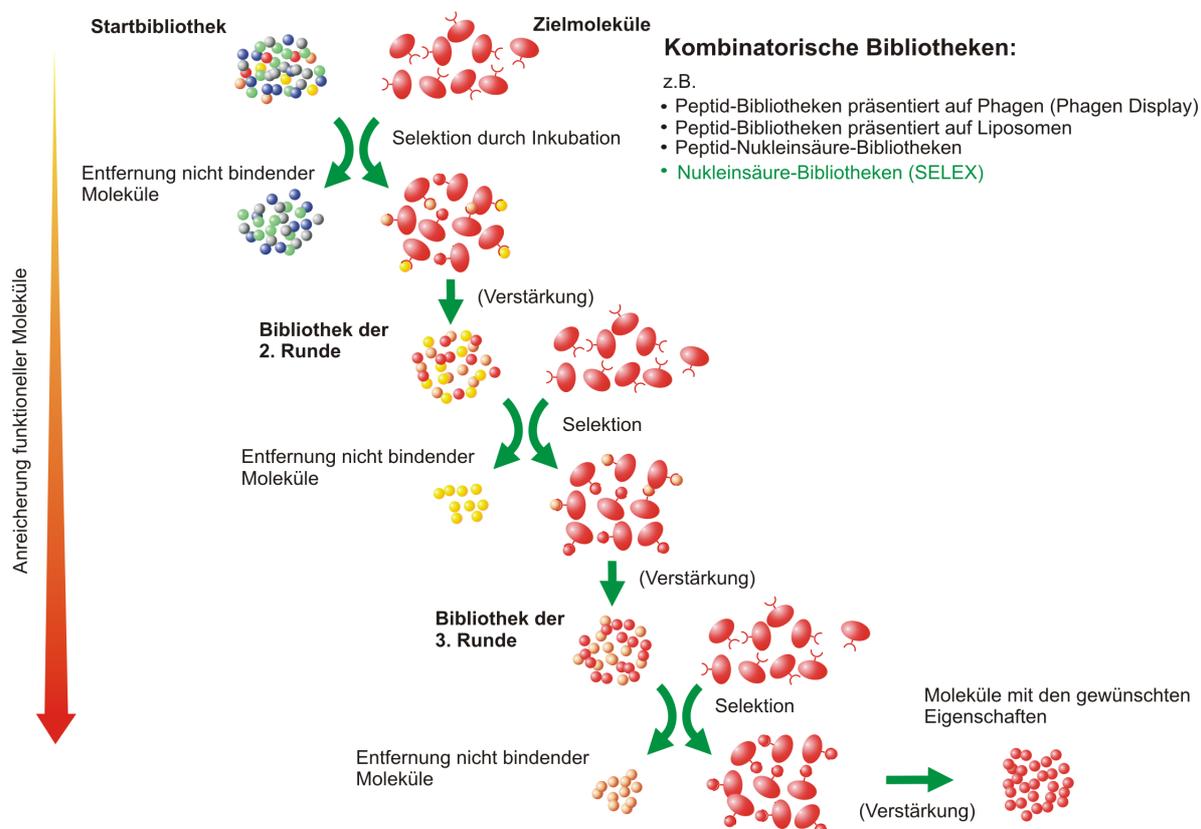
Für die vorliegende Dissertation ergab sich das folgende Arbeitsprogramm:

- 1) Die Bereitstellung von Aptamerliganden zur Diagnose von (i) aktiviertem Endothel der Mikrovaskulatur im C6-Glioblastom des Rattenhirns und (ii) von aktiviertem Endothel in Gefäßen entzündlicher Regionen des EAE-Rattenhirns.
- 2) Die Aptamere sollten in Analogie zu Antikörpern erstmals als neuartige histologische Marker auf Gewebeschnitten eingesetzt werden. Histologische Untersuchungen sollten dabei das Endothel der aktivierten (pathologischen) Mikrovaskulatur vom Endothel in ruhenden (gesunden) Gefäßen unterscheidbar machen.
- 3) Außerdem sollte die auszuarbeitende Methode die Untersuchung der pathologischen Endothelzelle ermöglichen. Aus diesem Grund sollten Aptamerliganden zur Identifizierung und Visualisierung der pathologischen Mikrovaskulatur nicht gegen Proteine selektiert werden, deren Expression im Zuge der Endothelzell-Aktivierung bereits bekannt ist (z.B. VEGF-R oder VCAM-1; zusammengefasst in 33), sondern gegen ganze Endothelzellen als sog. „komplexe Zielstrukturen“. Der Einsatz von Endothelzellen mit einer Fülle an potenziellen Zielstrukturen sollte die Option bieten, Proteine zu identifizieren, deren Beteiligung in den komplexen Prozessen der Tumorangio-genese und/oder MS bislang unentdeckt oder unbeachtet blieben.

- 4) Die in SELEX-Experimenten bis dato übliche Radioaktivitätskontrolle zur Überwachung der Anreicherung von funktionellen Nukleinsäureliganden in den voranschreitenden Runden des kombinatorisch-chemischen *in vitro*-Evolutionprozesses sollte durch eine Fluoreszenzkontrolle ersetzt werden.

2 SELEX – eine Methode der kombinatorischen Chemie

Kombinatorisch-chemische Methoden ermöglichen die Identifizierung einzelner Moleküle mit der Eigenschaft, als Ligand gegen eine best. Zielstruktur fungieren zu können (34). Sie bedienen sich dabei einer so genannten Molekülbibliothek – einer komplexen Mischung von Molekülen (Schema 3). Im Zuge der Automatisierung traditioneller Synthesetechniken, mit deren Hilfe die Bereitstellung sehr umfangreicher Molekülbibliotheken ermöglicht wurde, folgte eine rasante Entwicklung auf dem noch jungen Gebiet der kombinatorischen Chemie (35). Die kombinatorisch-chemische Methode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) basiert auf der Isolierung von funktionellen, einzelsträngigen Nukleinsäureliganden (ssDNA oder RNA) aus riesigen Bibliotheken mit bis zu 10^{15} Molekülen (32). Verglichen mit anderen kombinatorischen Bibliotheken – z.B. Phagen Display mit bis zu 1×10^{11} auf Phagen präsentierten Peptiden (36) oder mit dem Immunrepertoire der Ratte (ca. 10^8 Immunglobuline) – bedient sich SELEX einer Startbibliothek derartiger Vielfalt, dass in ihr die Anwesenheit von Liganden gegen praktisch jede beliebige Zielstruktur implementiert werden kann.



Schema 3. Liganden gegen definierte Zielstrukturen werden aus Molekülbibliotheken isoliert: Wiederholte Inkubation der Bibliotheken mit Zielmolekülen, gefolgt von der Entfernung nicht bindender Moleküle und der Verstärkung der bindenden Moleküle resultiert in neue, bezüglich der Zielstruktur-Affinität angereicherte Bibliotheken. Am Ende dominieren Moleküle mit hoher Affinität die Bibliothek der letzten Selektionsrunde.

2.1 Der SELEX-Prozess

Die einzelsträngigen Nukleinsäuremoleküle einer SELEX-Bibliothek beinhalten eine Sequenz zufälliger Basenabfolge. Durch die Ausbildung intramolekularer Basenpaare kann somit jedes Molekül eine individuelle 3-dimensionale Form einnehmen (Abb.1A), welche die Oberflächenstruktur von Zielmolekülen erkennen und fest an sie binden können. Die mittels SELEX identifizierte ssDNA (single stranded DNA) (37) oder RNA Liganden (38) – Aptamere genannt (lat. aptus: passen) – können somit in Analogie zu Antikörpern als Diagnostika oder Therapeutika fungieren.

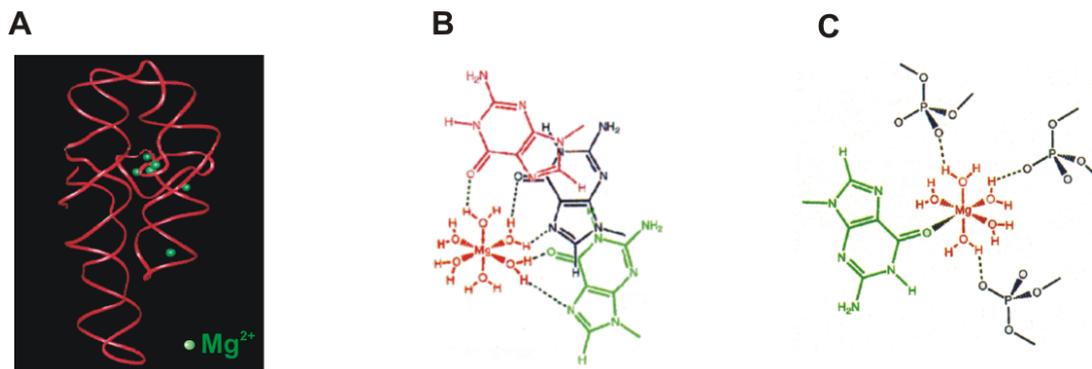
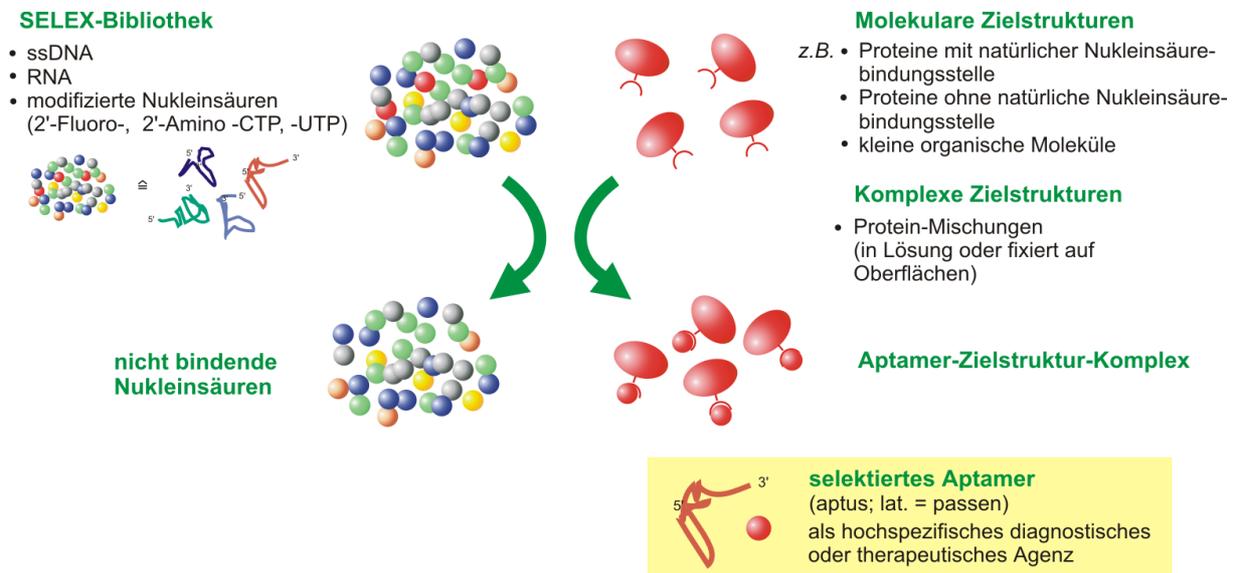


Abb. 1. Die Ausbildung von intramolekularen Basenpaaren und die Einlagerung bivalenter Kationen (B, C) ermöglicht einzelsträngigen Nukleinsäuren die Ausbildung starrer Tertiärstrukturen (A)

Die zusätzliche Einlagerung von bivalenten Kationen mit der Fähigkeit, Guaninbasen (B) und Phosphatgruppen (C) miteinander zu verknüpfen, verleihen dem Aptamer einen hohen Grad an molekularer Starrheit in Lösung und somit die Fähigkeit, das jeweilige Zielmolekül mit hoher Genauigkeit zu erkennen und mit großer Affinität und Spezifität zu binden. Diese konformelle Komplexität bedeutet, dass eine SELEX-Bibliothek als Quelle von Aptameren gegen eine große Vielfalt an Zielstrukturen (Schema 4) herangezogen werden kann. Die Molekülklassen, gegen welche die SELEX-Technik bis dato erfolgreich eingesetzt wurde, sind vielfältig. Darunter Peptide (39, 40), Aminosäuren (41, 42), kleine organische Moleküle (43, 38), Polysaccharide (44) und Proteine (45). Aptamere binden nicht nur Proteine, deren natürliche Aufgabe darin besteht mit Nukleinsäuren zu interagieren (z.B. Polymerasen) (37), sondern erkennen auch Proteine, die natürlicherweise keine Nukleinsäuren binden (z.B. Wachstumsfaktoren (46), Antikörper (47) oder Hormone (48)). Einige der affinsten Aptamere haben Dissoziationskonstanten im Bereich von 100 pM (46, 58). Aptamere zeichnen sich durch ihre bemerkenswerte Spezifität aus und können Zielmoleküle anhand feinsten struktureller Unterschiede erkennen. Aptamere sind beispielsweise in der Lage, die An- bzw. Abwesenheit einer Methyl- (43) oder Hydroxylgruppe (49) zu erkennen oder das D-

und L-Enantiomer kleiner organischer Verbindungen (50) voneinander zu unterscheiden. Aptamere können auch gleichzeitig gegen unterschiedliche Proteine selektiert werden. Solche Gemische molekularer Zielstrukturen werden „Komplexe Zielstrukturen“ genannt und können beispielsweise in Form einer Lösung oder Suspension, aber auch auf Oberflächen fixiert der Nukleinsäurebibliothek präsentiert werden (51).



Schema 4. Der SELEX-Prozess erlaubt die Identifizierung von einzelsträngigen Nukleinsäureliganden gegen eine Vielzahl unterschiedlichster Zielstrukturen.

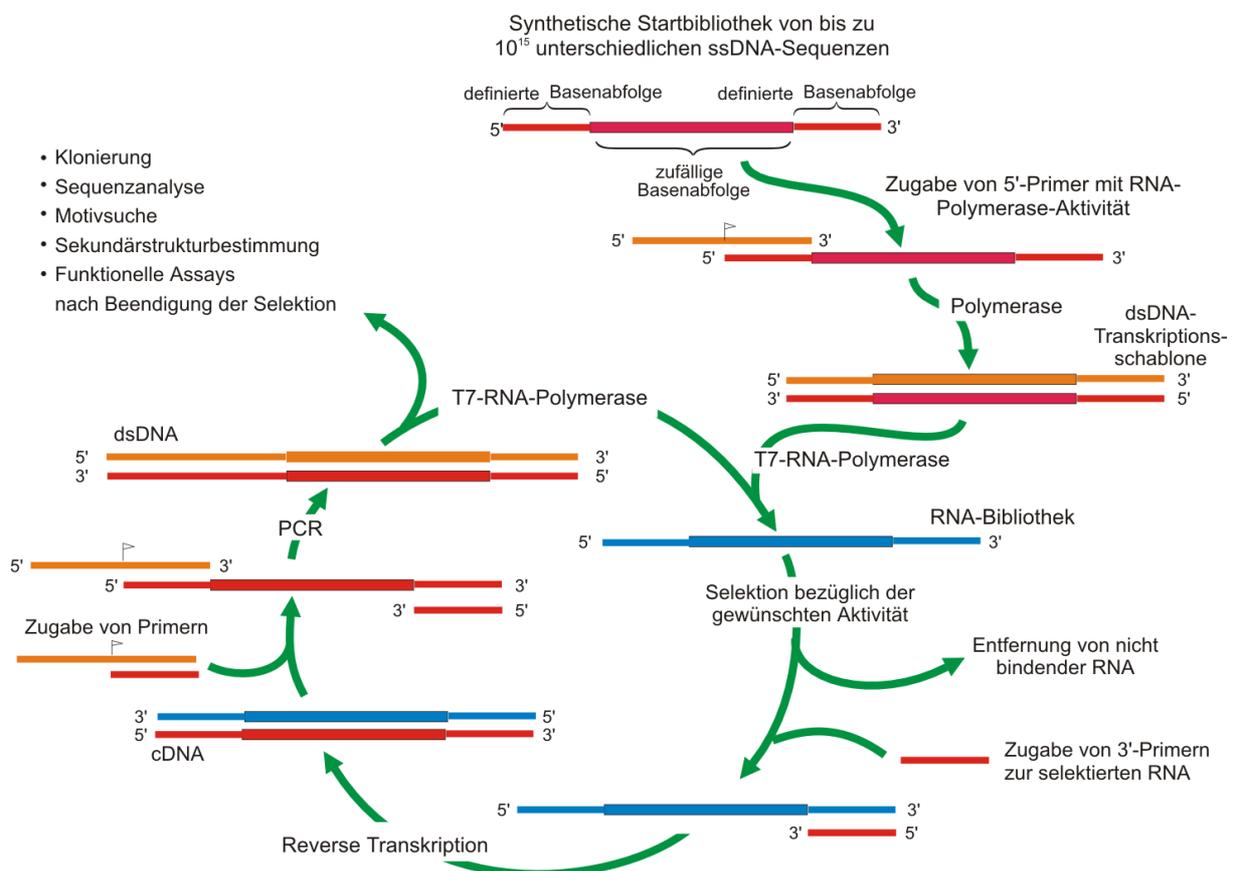
Die SELEX-Methode wurde 1990 zeitgleich von Larry Gold (37) und Andrew E. Ellington (38) entwickelt. Beide Ansätze basieren auf dem Prinzip der selektiven Erkennung von Zielstrukturen, vermittelt durch die 3-dimensionale Form von einzelsträngigen Nukleinsäuren. Gold verwendete ssDNA, Ellington hingegen RNA mit definierter Oberflächenstruktur. Die Verwendung von 2'-Fluoro- oder 2'-Amino-Mononukleotid-Triphosphat modifizierten RNA-Bibliotheken ermöglicht die Gewinnung von RNase-resistenten Aptameren (52). Derart modifizierte Aptamere haben das Potenzial, auch in biologischen Flüssigkeiten (Blut, Urin) als Sonde zu fungieren (53).

2.1.1 Der DNA-SELEX Prozess

Aptamere einer synthetisch erzeugten Startbibliothek können durch Inkubation mit dem gewünschten Zielmolekül selektiert werden (Schema 5). Die Separation der Polynukleotide mit Affinität bezüglich des eingesetzten Zielmoleküls von denen ohne substanzielle Affinität ist ein Schlüsselschritt im SELEX-Prozess und erfolgt bei Experimenten, in denen gereinigte Proteine die Zielmoleküle darstellen – üblicherweise durch Filtration über Nitrozellulose. Das

2.1.2 Der RNA-SELEX-Prozess

Beim RNA-SELEX-Prozess (Schema 6) dient die synthetische ssDNA zunächst als Transkriptionsschablone zur Herstellung von RNA-Bibliotheken: Der Einbau eines 5'-Primers mit RNA-Polymeraseaktivität und anschließende Transkription führen zum Erhalt der entsprechenden RNA-Bibliothek. Nach Selektion bezüglich der gewünschten Aktivität durch Inkubation mit dem Zielmolekül und der Entfernung nicht bindender RNA aus dem Selektionszyklus werden die selektierten RNA-Sequenzen zur Verstärkung mittels PCR zunächst in cDNA transkribiert. Das dsDNA-PCR-Produkt dient dann wieder als Transkriptionsschablone zur Erzeugung der bezüglich Affinität gegenüber dem Zielmolekül angereicherten RNA-Bibliothek der zweiten Selektionsrunde. Wiederholte Zyklen von Selektion und Verstärkung setzen den Evolutionsprozess fort.



Schema 6. Schematischer Ablauf des RNA-SELEX-Prozesses

2.1.3 Anreicherungskontrolle

Zur Beurteilung, wie weit der Selektionsprozess fortgeschritten ist und nach welchem Zyklus er als abgeschlossen betrachtet werden kann, muss die Anreicherung bindender Aptamere in den Bibliotheken der aufeinanderfolgenden Selektionsrunden überwacht werden. Bis dato

wird der Anreicherungsprozess radioaktiv kontrolliert. Durch radioaktive Markierung der Nukleinsäuresequenzen (mit [α - 32 P]-ATP) und Messung der Radioaktivität der Zielmolekül-Aptamer-Komplexe kann die Anreicherung bindender Liganden in den Bibliotheken der aufeinanderfolgenden Selektionsrunden beurteilt werden. Nimmt die Radioaktivität dieser Komplexe nicht mehr entscheidend zu, kann der Selektionsprozess als beendet betrachtet werden (Abb. 2) (55). Der Anteil an Zielmolekül-bindenden Aptameren in der Bibliothek der letzten Selektionsrunde ist dann in aller Regel groß genug, um aus ihr mit ausreichender Trefferwahrscheinlichkeit individuelle bindende Aptamere isolieren und charakterisieren zu können.

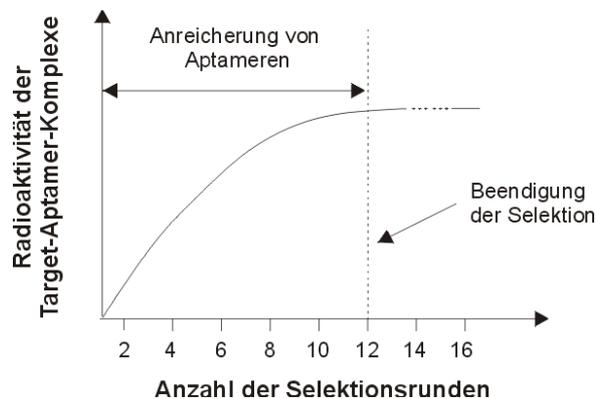


Abb. 2. Anreicherungskontrolle zur Beurteilung des Selektionsprozesses

2.1.4 Charakterisierung von Zielstruktur-bindenden Aptameren

Zur Charakterisierung individueller Aptamere aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde werden deren Sequenzen in ein geeignetes Plasmid ligiert und das Plasmid-Aptamer-Konstrukt nach Transformation in Bakterien vervielfältigt. Die Bakterien werden auf Nährboden ausplattiert und die wachsenden Bakterienkolonien – jede enthält Plasmide mit einer einzigen individuellen Aptamersequenz – isoliert. Die Plasmide werden präpariert und die enthaltene Basensequenz des Aptamers mittels PCR mit den Bibliothek-spezifischen Primern vervielfältigt. Nach Isolierung des Aptamerstranges durch Abtrennung des biotinylierten Templatestranges (DNA-SELEX) bzw. nach dem Umschreiben des dsDNA-PCR-Produktes mit RNA-Polymerase (RNA-SELEX) erhält man individuelle Aptamere. Diejenigen, die das Zielmolekül spezifisch erkennen und binden, können dann mittels geeigneter Tests von nicht-bindenden Nukleinsäuren unterschieden werden (55).

Die Ermittlung der Basenabfolge spezifisch an die Zielstruktur bindenden Aptamere dient u.a. der Charakterisierung von Sekundärstrukturmotiven innerhalb jeder Aptamersequenz. Diese

Motive (Hairpin-Loop, Bubble, Bulge, Pseudoknot oder G-Quartetts, siehe Abb. 3) sind das Pendant zur bindenden Region im variablen Teil von Antikörpern und für die eigentliche Interaktion mit dem Zielmolekül verantwortlich. Die einzelsträngigen Bindungsmotive (rot) sind flankiert von doppelsträngigen Bereichen – von Regionen intramolekularer Basenpaare (schwarz) mit der Fähigkeit, die Konformation der Bindungsmotive zu fixieren (entsprechend dem konstanten Teil von Antikörpern) (56).

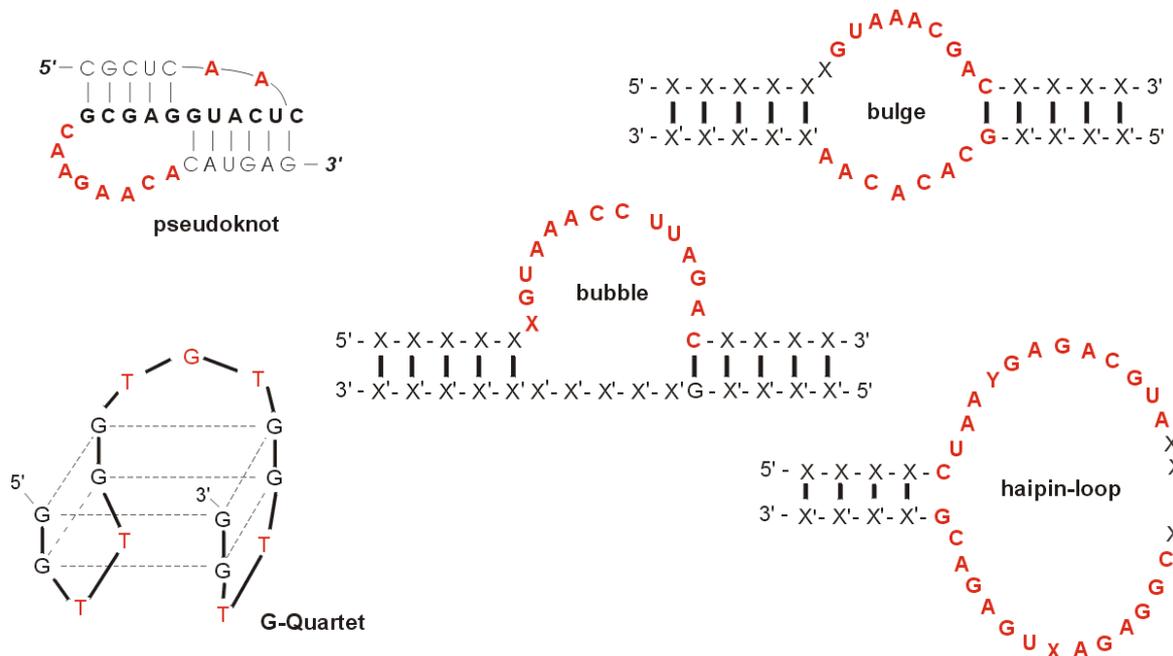
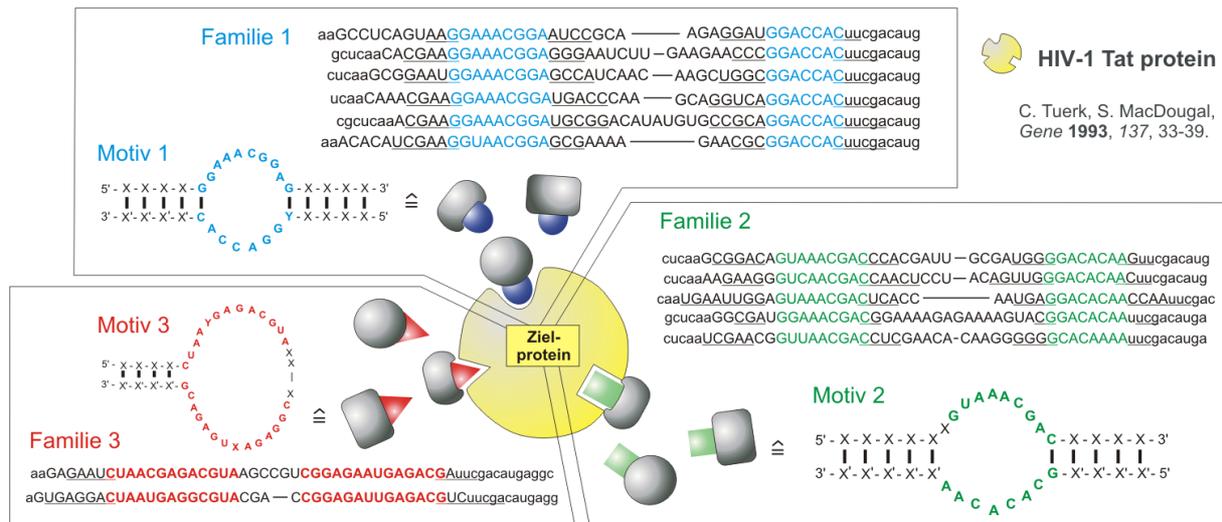


Abb. 3. Bekannte Bindungsmotivkonformationen von Aptameren

Der Sequenzvergleich (Alignment) bindender Aptamere erlaubt in vielen Fällen das Auffinden von Sequenzen homologer Basenabfolge und somit deren Eingruppierung in Familien (57-59). Jede Aptamerfamilie erkennt in der Regel eine andere Region des Zielmoleküls. Computerunterstützte Faltung zu Sekundärstrukturen erlaubt ihre Einteilung in drei der fünf bislang bekannten Motiv-Konformationen (Pseudoknots und G-Quartett werden von Computerprogrammen zur Ermittlung der Sekundärstruktur bislang nicht erkannt). Mit diesen Kenntnissen ist es möglich, das Aptamer auf seine wesentlichen, für die Bindung benötigten Merkmale zu minimieren: Nukleotide der entscheidenden Bindungsmotive (Abb. 3, rot) sowie die sie stabilisierenden Basenpaare („Stem“ genannt, schwarz) werden belassen und Nukleotide, die weder an Motiv- noch an Stem-Bildung beteiligt sind, entfernt. Die dadurch erhaltenen so genannten „Truncated Minimal High Affinity Ligands“ übertreffen das ursprünglich selektierte, vollständige Aptamer oft in puncto Stabilität, Affinität und Selektivität.

Aptamere aus unterschiedlichen Familien (die an räumlich voneinander getrennte Regionen des Zielmoleküls binden) konkurrieren im Wettbewerb um freie Bindungsstellen während des Selektionsprozesses nicht miteinander. Wohingegen Aptamere derselben Familie (die gegen die gleiche Bindungsstelle gerichtet sind) einer natürlichen Selektion zugunsten der affineren Aptamere unterliegen. Jede Familie besteht aus mehr oder weniger affin und selektiv bindenden Aptameren gegen eine andere Bindungsstelle auf der Proteinoberfläche (Schema 7).



Schema 7. Selektion mehrerer RNA-Aptamerfamilien am Beispiel des HIV-Tat-Proteins

Aptamere, die an funktionelle Einheiten binden, haben das Potenzial, intra- oder extrazelluläre Signalwege zu aktivieren oder zu inhibieren (60-62). Beispielsweise kann durch Blockierung der aktiven Bindungsstelle der natürliche Bindungspartner des Zielproteins in seiner Funktion inhibiert werden: Jellinek und Mitarbeiter (63) haben ein Aptamer gegen den VEGF-Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor) entwickelt. Der Aptamer-VEGF-Komplex kann nicht mehr an seine natürlichen Gegenspieler (VEGF-Rezeptoren) binden, wodurch die endotheliale VEGF-Aktivierungskaskade blockiert wird (64). Das anti-VEGF-Aptamer ist bislang der einzige in klinischen Tests erprobte Vertreter dieser neuartigen Substanzklasse.

Trotz erster therapeutischer Erfolge des anti-VEGF-Aptamers liegt das unmittelbare Potenzial von Aptameren – vor allem aufgrund unvollständiger Kenntnisse ihrer Pharmakokinetik – in ihrer Anwendung als diagnostisches Werkzeug zum Nachweis von Zielstrukturen außerhalb des Organismus. Pharmakokinetische Aspekte spielen dabei keine Rolle und ihre Lebensdauer (insbesondere die von DNA- und modifizierten RNA-Aptameren) ist ausreichend, um biologisches Gewebe zu testen (65).

3 Aptamere in der Diagnostik

In der Diagnostik waren während der letzten drei Jahrzehnte Antikörper das richtungsweisende Reagenz. Infolgedessen wurden heutzutage übliche diagnostische Plattformen auf den Einsatz von Antikörpern optimiert. Die Entdeckung von Aptameren lässt jedoch erwarten, dass sie aufgrund einer Reihe von Vorteilen gegenüber konventionellen Antikörpern deren bis dato unbestrittene Sonderstellung in diagnostischen Tests zukünftig streitig machen werden. Die Nachfrage für diagnostische Tests zur Untersuchung von Krankheiten nimmt zu und Aptamere haben das Potenzial, in neuen Tests die Aufgabe der molekularen Erkennung effizienter zu übernehmen. Da die SELEX-Technologie Einschränkungen der Antikörpertechnologie zu umgehen vermag, wird in zahlreichen universitären und industriellen Einrichtungen intensiv an der Entwicklung von Diagnostika auf der Grundlage von Aptameren gearbeitet (66).

3.1 Aptamer- vs. Antikörpertechnologie

Kohler und Milstein berichteten 1975 von der Entdeckung der monoklonalen Antikörpertechnologie (67). Ein selektierter Klon kann heutzutage kontinuierlich kultiviert werden, um den monoklonalen Antikörper (mAb) der Wahl zu synthetisieren. Theoretisch ist die Lebensspanne einer mAb-produzierenden Zellkultur und die Menge an Antikörpern, die hergestellt werden kann, unbegrenzt. Das Immunogen, das benutzt wird, um mAb zu identifizieren, muss außerdem nicht rein sein. Diese Eigenschaften haben die immunologische Forschung revolutioniert und die Anwendungen von Antikörpern in diagnostischen Tests ausgeweitet. Trotzdem gibt es gewisse, die Antikörpertechnologie begleitende Einschränkungen (66):

(i) Der Prozess zur Identifizierung von Antikörpern beginnt im Tier. Somit gestaltet sich die Herstellung von Antikörpern gegen Zielstrukturen, die vom Tier nicht gut vertragen werden (z.B. Toxine), als sehr schwierig. Außerdem können Antikörper gegen Moleküle, die weniger immunogen sind, nur sehr schwer identifiziert werden (68).

(ii) Die Suche nach seltenen Antikörpern macht die Testung einer umfangreichen Anzahl von Kolonien nötig. Die Identifizierung und Herstellung seltener mAb ist somit arbeitsintensiv.

(iii) Die Antikörperqualität (Bindungsspezifität und Aktivität) unterschiedlicher Produktionschargen variiert häufig. Immunologische Tests mit unterschiedlichen Antikörperchargen müssen deswegen häufig neu optimiert werden.

(iv) Obwohl Antikörper der Diagnose von Veränderungen von *in vivo*-Parametern dienen, wird ihre Herstellung durch *in vivo*-Parameter eingeschränkt. Die mAb-vermittelte Identifizierung von Zielmolekülen unter nicht-physiologischen Bedingungen ist nicht realisierbar (69).

(v) Kinetische Parameter der mAb-Zielmolekül-Wechselwirkung können nicht gesteuert werden.

(vi) Antikörper sind temperaturabhängig und denaturieren irreversibel. Sie haben nur eine geringere Lebensdauer.

Gegenwärtig werden verschiedenartige Methoden entwickelt, die diese Limitierungen der Hybridom-basierten Antikörpertechnologie zu umgehen versuchen. Solche Technologien, welche die Humanisierung von Antikörpern (70, 71), die Präsentation von Peptidbibliotheken auf Phagen (26, 29, 30, 72, 73) bzw. Liposomen (74-76), Antikörper Engineering (77) und *in vitro*-Immunisierung (78) beinhalten, sind in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung. Obwohl es mit diesen Ansätzen möglich ist, Nachteile der Antikörpertechnologie zu reduzieren, weisen die durch solche Methoden produzierten Liganden dennoch eine Gemeinsamkeit auf, der als limitierender Faktor im Selektionsprozess betrachtet werden muss: Die eigentlichen, zur molekularen Erkennung befähigten Peptideinheiten dieser Liganden müssen zur Stabilisierung ihrer Konformation im Kontext eines größeren Konstrukts präsentiert werden (beispielsweise im Kontext eines größeren Proteins oder fixiert auf Phagen bzw. Liposomen). Auf Strukturerkennung mittels Peptideinheiten basierende Verfahren können somit keine Epitope erkennen, die für die sterisch anspruchsvollen Liganden unzugänglich sind. In kombinatorisch-chemischen Experimenten gegen ganze biologische Einheiten limitieren diese strukturellen Anforderungen die Anzahl an Zielstrukturen, gegen welche Liganden hergestellt werden können (79).

Alternativ können die viel kleineren Aptamere dazu herangezogen werden, die Unzulänglichkeiten der peptidvermittelten Erkennung mittels Antikörper oder Phagen zu umgehen. In diesem Zusammenhang haben Aptamere folgende Vorteile (66):

(i) Selektionsbedingungen können angepasst werden, um Aptamere zu selektieren, die gewisse Anforderungen diagnostischer *in vitro*-Methoden erfüllen – z.B. das Zielmolekül in einem nicht physiologischen Puffer oder unter nicht physiologischen Temperaturen zu binden.

Gleichmaßen können kinetische Parameter, wie die „An- und Ausrate“ von Aptameren, gesteuert werden (durch Temperatur- oder pH-Wechsel oder durch Änderung der Salzkonzentration des Puffers).

(ii) Aptamere können in einem *in vitro*-Prozess identifiziert werden, der nicht von Tieren, Zellen oder *in vivo*-Bedingungen unabhängig ist.

(iii) Aptamere werden mit einem hohem Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit chemisch synthetisiert. Sie werden unter stringenten, denaturierenden Bedingungen gereinigt und überzeugen daher durch einen hohen Reinheitsgehalt. Aus diesem Grund wird bei der Aptamerproduktion keine Variation zwischen unterschiedlichen Chargen erwartet (80).

(iv) Reporter- oder Adaptermoleküle, wie beispielsweise Fluoreszein oder Biotin, können punktgenau an definierte Stellen des Aptamers angebracht werden (68).

(v) Die Denaturierung von Aptameren ist reversibel. Einmal denaturiert, können funktionelle Aptamere innerhalb von Minuten regeneriert werden. Sie können über einen sehr langen Zeitraum stabil aufbewahrt und problemlos transportiert werden.

(vi) Die Tatsache, dass die Erkennung der Zielstruktur häufig von relativ einfachen Sekundärstrukturmotiven abgeleitet werden kann, ermöglicht eine post-SELEX-Modifizierung der Aptamere zur Stabilisierung gegenüber hohen Temperaturen (81) oder enzymatischem Verdau (82).

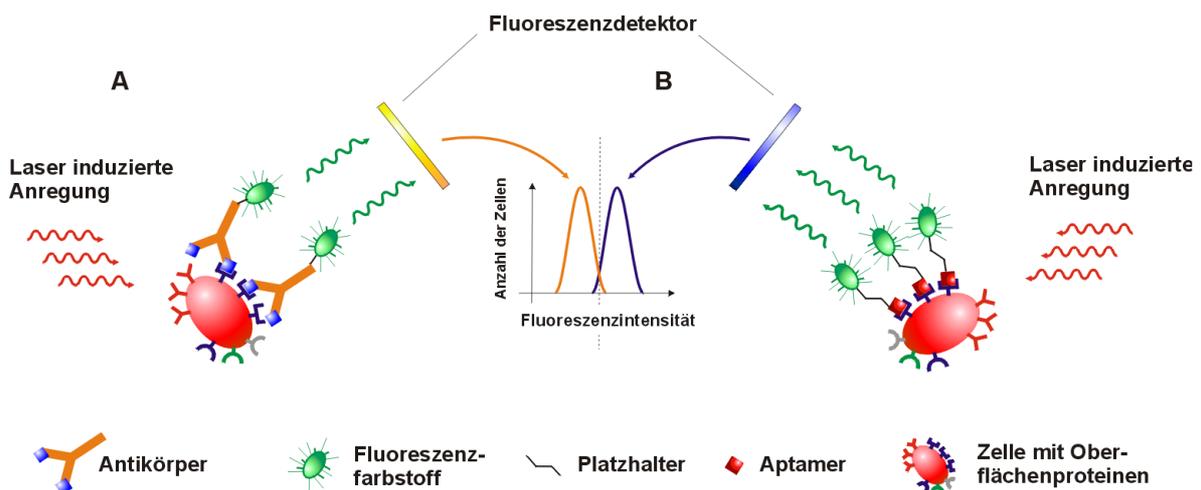
Trotz der viel versprechenden Aussichten steckt die Aptamer-Forschung noch in den Anfängen – sie holt jedoch in großen Schritten auf. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Aptamere ihre Anwendung in standardisierten diagnostischen Tests finden werden. Die großen Märkte der Immundiagnostik erwarten einen zunehmenden Wettkampf mit „Test-Kits“, basierend auf der selektiven Erkennung von Zielmolekülen mittels Aptameren (65, 83). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben zudem begonnen, auf Antikörpern basierende diagnostische Plattformen auf Aptamere zu übertragen. Da es in klinischen Fragestellungen gilt, radioaktive Marker zu vermeiden, liegt der Trend hierbei in der Entwicklung von nicht radioaktiven Nachweisverfahren. Eine Möglichkeit, die Erkennung von Aptamer-Zielmolekül-Komplexen zu vereinfachen, ist, das Aptamer an ein Enzym oder Reportermolekül zu koppeln, dessen Aktivität leicht erkannt werden kann.

3.2 Aptamere in Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Der erste, auf Aptameren basierende diagnostische Test wurde von D. Drolet und Mitarbeitern durchgeführt (68). Sie synthetisierten ein anti-VEGF-Aptamer, dessen 5'-Ende mit einem Fluoreszein-Molekül gekoppelt wurde. In die einzelnen Kammern einer mit einem anti-VEGF-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte wurde jeweils eine definierte Menge VEGF gegeben und mit dem fluoreszein-markiertem anti-VEGF-Aptamer überschichtet. Nach Zugabe eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Fluoreszein-Antikörpers und eines chemoluminiszierenden Substrats der alkalischen Phosphatase ließen sich die relativen Quantitäten von VEGF in jeder Kammer der Mikrotiterplatte bestimmen. In jedem Schritt musste lediglich gewaschen und ein neues Reagenz zugegeben werden. Die Prozedur war relativ einfach durchzuführen und die Messung waren quantitativ und genau.

3.3 Aptamere in der Durchflusszytometrie

Aptamere konnten auch in direkteren Methoden zum Nachweis bestimmter Zielstrukturen auf Oberflächen herangezogen werden. K. Davis und Mitarbeiter (84) beschichteten Polystyren-Kügelchen mit HNE-Protein (Human Neutrophil Elastase) und inkubierten diese anschließend mit fluoreszenzmarkiertem anti-HNE-Aptamer. Die Fluoreszenzlichtemission der durch einen Laser angeregten HNE-Aptamer-Komplexe auf den Kügelchen konnte am Durchflusszytometer (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorter) detektiert werden.



Schema 8. Durchflusszytometrische Analyse zellulärer Zielstrukturen mittels **A**, fluoreszenzmarkierter Antikörper bzw. **B**, fluoreszenzmarkierter Aptamere. Ein Platzhalter zwischen Aptamer und Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht eine – im Vergleich zu Antikörpern – gesteigerte Fluoreszenzintensität und somit eine Erniedrigung der Nachweisgrenze.

HNE-beschichtete Kügelchen konnten dadurch von unbeschichteten unterschieden werden. Durch das Einfügen bestimmter Platzhalter (Ethylenglycol) zwischen Aptamer und Fluoreszenzreportermolekül konnte dabei die Sensitivität von Antikörpern sogar übertroffen werden. Eine vergleichbare Versuchsanordnung konnte auf Zellen übertragen werden: Fluoreszenzmarkierte anti-CD4-Aptamere konnten ihre Zielstruktur auf der Oberfläche von T-Zellen nachweisen (85) und sie somit von nicht CD4-tragenden Zellen in einer heterogenen Zellpopulation unterscheiden.

3.4 Aptamere in der Biosensorik

In besonderen klinischen Notfallsituationen (z.B. der Diagnose im Laufe einer OP oder während eines Rettungseinsatzes) muss die analytische Detektion und Quantifizierung möglichst vor Ort, innerhalb kürzester Zeit erfolgen. Kleine tragbare Geräte, die auf dem Prinzip der molekularen Erkennung basieren, wurden für diese Zwecke entwickelt. Im günstigsten Falle sollte der Sensor drei wesentliche Kriterien erfüllen (86): Er sollte (i) das eingetretene Bindungsereignis (die Anwesenheit und Menge des zu bestimmenden Zielmoleküls) ohne den Zusatz eines weiteren Reagenzes übermitteln können, (ii) das Zielmolekül auch in kleinsten Konzentrationen und kürzester Zeit detektieren und quantifizieren können und (iii) der Sensor sollte regenerierbar sein, um mehrmals benutzt werden zu können.

Auf der Sensoroberfläche immobilisierte Antikörper haben zwar das Potenzial, das gewünschte Zielmolekül sensitiv und selektiv zu erkennen (87), eine offensichtliche Einschränkung ist jedoch die fehlende Fähigkeit, die Antikörperoberfläche zu regenerieren. Die dafür notwendigen stringenten Bedingungen würden die Bindungsfähigkeit der Antikörper zerstören. Auf Aptameren basierende Sensoren hingegen können (i) problemlos denaturiert, gewaschen und renaturiert werden. Hohe Temperaturen und Salzkonzentrationen oder chelatisierende Reagenzien können die Aptameroberfläche regenerieren, ohne ihre Funktionalität zu zerstören. (ii) Homogene Präparationen von chemisch hergestellten Aptameren können mit Linkern präzise und in der gewünschten Dichte auf festen Oberflächen immobilisiert werden. (iii) Ihre leichte Modifizierbarkeit mit einer großen Auswahl an Reportermolekülen ermöglicht außerdem die Entwicklung und Gestaltung einer Vielfalt an Detektionsmethoden. Kleinjung und Mitarbeiter (88) beschichteten eine mit Streptavidin derivatisierte Papierfaseroberfläche mit biotinyliertem Aptamer, um fluoreszenzkonjugiertes L-Adenosin enantioselektiv nachzuweisen. In einer anderen Anwendung wurde

fluoreszenzkonjugiertes anti-Thrombin-Aptamer auf einer Glasfläche fixiert und eingetretene Bindungsereignisse mit Thrombin mittels „Evanescent Wave Induced Fluorescence“ detektiert (86). Die Detektionen waren sensibel und die Aptameroberfläche konnte nach erfolgter Detektion problemlos regeneriert werden.

3.5 Aptamere zur Detektion von immobilisierten Proteinen („Eastern Blotting“)

Eines der einfachsten Formate zur Detektion bestimmter Proteine beinhaltet die Immobilisierung des Zielmoleküls auf einer Membran. Durch hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen einmal auf der Membran fixiert, wird das Zielmolekül durch einen mit einem Reporter-molekül konjugierten Liganden detektiert. Zum Erhalt klar interpretierbarer Signale muss stringent gewaschen werden, um den unspezifischen Hintergrund zu eliminieren. Beim Western Blotting werden auf einer Membran immobilisierte Proteine mittels einem mit Reporter-molekül gekoppelten Antikörper detektiert. Da auch Aptamere in der Lage sind, Proteine mit hoher Affinität und Spezifität zu binden, können auch diese benutzt werden, um auf einer Membran immobilisierte Proteine nachzuweisen. Diese Technik könnte als „Eastern Blotting“ bezeichnet werden (66) und somit die Nomenklatur der Blotting-Techniken vervollständigen (in Southern- und Northern-Blotting-Techniken werden mit Reporter-molekül gekoppelte Oligonukleotide dazu benutzt, auf Membranen immobilisierte DNA bzw. RNA zu detektieren).

N. Kawazoe und Mitarbeiter (80) immobilisierten auf einem Polyesterfilm Folsäure in einem bestimmten Muster und färbten diese mit einem fluoreszenzkonjugierten anti-Folsäure-Aptamer. Das Muster konnte fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. Y. Lin und Mitarbeiter (48) detektierten nach Dottblott-Manier mit einem Aptamer gegen das Thyroid-Stimulating-Hormon (hTSH) das auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisierte Hormon. Unterschiedliche Konzentrationen von hTSH konnten mittels eines radioaktiv markierten Aptamers in Abhängigkeit der Dosis detektiert werden.

3.6 Aptamerarrays zur Proteomanalyse

L. Gold und Mitarbeiter (89) entwickeln derzeit das Pendant zu DNA-Microarrays, einer High-Throughput-Methode, die mittels auf Chips fixierter ssDNA die Detektion von komplementärer mRNA aus biologischen Material erlaubt. Mithilfe solcher DNA-Microarrays ist man in der Lage, das Genexpressionsmuster bestimmter Erkrankungen zu

bestimmen (90). In vielen, aber nicht in allen Fällen darf aufgrund der Anwesenheit von mRNA auf die Expression des durch sie kodierten Proteins gefolgert werden. Nur ein Teil der mRNA wird wirklich translatiert und ist konsequenterweise auch nur dann von funktioneller Bedeutung. Vielversprechend ist daher der Ansatz von Gold und Mitarbeiter mittels auf Chips fixierten Aptameren direkt das zugehörige Protein nachzuweisen. Aptamere können gemäß Standardmethoden kontrolliert auf Microarrays kovalent fixiert werden (91, 92). Anschließende Inkubation der Arrays mit biologischen Flüssigkeiten oder Zelllysaten ermöglicht die Bindung der entsprechenden Proteine, die dann mit gebräuchlichen Proteinfarbstoffen angefärbt und im Rahmen von quantifizierbaren Proteinexpressionsmustern (die pathologische Bedingungen realistischer als mRNA-Muster wiederzuspiegeln vermögen) nachgewiesen werden können (89, 93).

Obwohl zur Charakterisierung des zellulären Phänotyps derzeit auch auf Antikörpern basierende Microarrays entwickelt werden (94), sind Aptamerarrays vergleichsweise sehr attraktiv: *(i)* Aptamere können mit definierter Dichte und sehr präzise an der gewünschten Stelle (mittels bereits existierender Technologien zur Erzeugung von DNA-Microarrays) auf Oberflächen fixiert werden; *(ii)* homogene Präparationen von Aptameren sind durch chemische Synthesen einfach zugänglich und *(iii)* auf Aptameren basierende Microarrays sind aufgrund ihrer Stabilität robust und versprechen eine große Haltbarkeit.

Die Bereitstellung einer großen Anzahl von Aptameren ist derzeit der Flaschenhals der Aptamer-vermittelten Proteomforschung. Die Automatisierung der Aptamerproduktion für diagnostische Chips gegen bereits bekannte Proteine entwickelt sich jedoch rasant. Die intensive Entwicklungsarbeit, welche die Industrie in die automatisierte Aptamerproduktion investiert (95), verdeutlicht den Stellenwert und das enorme Potenzial von Aptamerarrays zur Proteomanalyse im Speziellen und von Aptameren als Liganden für diagnostische Tests im Allgemeinen (66).

Eine weitere Möglichkeit zur Bereitstellung einer großen Anzahl von Aptameren stellt – neben der automatisierten Produktion gegen einzelne bekannte Proteine – die simultane Produktion von Liganden gegen komplette biologische Einheiten – gegen so genannte komplexe Zielstrukturen – dar.

4 Selektion von Aptameren gegen komplexe Zielstrukturen

Gold und Mitarbeiter (96) haben anhand der Selektion von ssDNA-Aptameren gegen Membranen Roter und Weißer Blutkörperchen gezeigt, dass Liganden gegen mehrere Zellmembranproteine der komplexen Zielstrukturen simultan selektiert werden können. SELEX gegen ganze biologische Einheiten – Komplex-SELEX genannt – ist unabhängig von Kenntnissen über ihre Zusammensetzung. Es hat somit das Potenzial zur Identifizierung sowohl von unbekanntem Proteinen als auch von Proteinen, deren Vorhandensein in bestimmten biologischen Einheiten nicht vermutet wurde. Selektionen gegen intakte biologische Einheiten können ein effizientes Mittel sein, um biologische Systeme wie Serum, Blut, Urin, ganze Zellen oder Gewebe zu untersuchen. Obwohl komplexes SELEX in der Lage ist, bekannte und unbekannte molekulare Strukturen in ihrem komplizierten Netzwerk von Wechselwirkungen im Körper aufzuspüren, und der differenzielle Vergleich von gesundem und kranken Gewebe das Potenzial hat, krankheitsassoziierte Faktoren zu identifizieren, wurden bislang nur wenige Komplex-SELEX-Experimente durchgeführt. Neben den Membranen von Blutkörperchen wurden beispielsweise ganze Ribosomen von *E. coli* (97), Viruspartikeln (98) oder lebenden Trypanosomen (99) (ein durch die Tsetsefliege übertragener Parasit) als komplexe Zielstruktur eingesetzt. Der Grund für die geringe Anzahl ist möglicherweise, dass Komplex-SELEX nur wirklich dann neue Erkenntnisse liefert, wenn aus der angereicherten Bibliothek der letzten Selektionsrunde effizient individuelle Liganden selektiert und identifiziert werden können, die an Moleküle binden, welche innerhalb des komplexen Gemisches molekularer Zielstrukturen von Interesse sind. Dieser Identifizierungsprozess, der die Unterscheidung von relevanten und irrelevanten Aptamerliganden aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde ermöglicht, wird Dekonvolution-SELEX genannt (96). Eine geeignete Dekonvolution-SELEX-Strategie ist Voraussetzung für die Interpretierbarkeit von Komplex-SELEX-Experimenten.

4.1 Systematische Evolution von DNA-Aptameren gegen die pathologische Blut-Hirnschranke

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bereitstellung von fluoreszenzmarkierten Aptameren zur selektiven Markierung von aktivierten Endothelzellen des pathologischen Rattenhirns. Die zu selektierenden Aptamere sollten in Analogie zu Antikörpern erstmals als histologische Marker auf Gewebeschnitten eingesetzt werden können. Sie sollten somit die Anzahl an Aptamer-basierten diagnostischen Tests (siehe Kap. 3) um eine Methode erweitern, welche

erstmalig ermöglichen sollte, mit Aptameren Zielstrukturen im Kontext des umgebenden Gewebes zu detektieren. Dabei sollte die pathologische BHS in experimentellen C6-Glioblastomen (5) und entzündlichen Regionen des EAE-Rattenhirns (100) erkannt und visualisiert werden. Das bedeutet, es sollten Aptamere gegen molekulare Adressen aktivierter Endothelzellen erzeugt werden. Ruhende Endothelzellen in Blutgefäßen des gesunden Gewebes sollten dabei nicht erkannt werden.

Zur Gewährleistung der Dominanz von Endothelzell-bindenden Aptameren in der Bibliothek der letzten Selektionsrunde und zur effektiven Evaluierung ihrer Affinität und Selektivität wurde eine neuartige, auf Fluoreszenzdetektion basierende Komplex-SELEX- und Dekonvolution-SELEX-Prozedur ausgearbeitet. Die an die Aptamere gestellten Anforderungen berücksichtigend – nämlich Zieladressen des aktivierten Endothels in ihrer natürlichen Umgebung zu erkennen, zu binden und zu visualisieren –, wurden zur Entwicklung der Selektionsprozedur folgende Kriterien berücksichtigt:

(i) Die Wahl der geeigneten Zielstruktur(en); (ii) die Wahl der geeigneten Nukleinsäurebibliothek; (iii) der Einsatz geeigneter Selektionsbedingungen; (iv) die Anwendung von Selektionsschritten zur effektiven Reduktion der Koselektion unerwünschter Nukleinsäuren; (v) der Einsatz geeigneter Dekonvolution-SELEX-Schritte zur effektiven Identifizierung einzelner funktioneller Aptamere aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde.

Sowohl die Überwachung der Anreicherung Endothelzell-bindender Aptamere in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionsrunden als auch die Identifizierung einzelner funktioneller Aptamere aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde sollten mittels Fluoreszenzdetektion erfolgen – die bis dato übliche radioaktiv kontrollierte Anreicherung also erstmalig Fluoreszenz-kontrolliert ablaufen.

4.2 Wahl der Zielstruktur – der Einsatz von Endothelzellkulturen als komplexe Zielstruktur

Die Selektion wurde gegen eine Adenovirus-12 SV40-transformierte Endothelzelllinie (YPEN-1) der Ratte gerichtet (101). Die Gründe für die Wahl dieser pathologischen – da aktiv wachsenden – Endothelzelllinie sind die folgenden:

(i) Es kann angenommen werden, dass in einer aktivierten Endothelzelllinie das Verhältnis von positiven und negativen Regulatoren der Endothelzell-Aktivierung auf die

Seite der positiven Regulatoren verschoben wurde (102). Die Selektion gegen aktiv wachsende Endothelzellen als komplette biologische Einheiten setzt kein volles Verständnis der komplizierten Mechanismen der Endothelzell-Aktivierung und der damit verbundenen Expression bestimmter Proteine voraus. Somit hat die Selektion gegen eine virus-transformierte Endothelzellkultur das Potenzial zur Identifizierung von Zielstrukturen, deren Vorhandensein und möglicherweise kritische Rolle im komplexen Vorgang der Endothelzell-Aktivierung unbekannt ist.

(ii) Aufgrund struktureller Unterschiede des Zielproteins binden Aptamere, die gegen die isolierte, rekombinante Form des Proteins selektiert wurden, nicht auch automatisch die native Form des Proteins (wie es in der natürlichen Umgebung auf der Endothelzelle komplexiert ist) (45). Bei der Selektion gegen intakte Endothelzellen können daher nur Aptamer-Liganden selektiert werden, die gegen Epitope der molekularen Zielstruktur gerichtet sind, die frei zugänglich sind und somit auf Gewebeschnitten auch erkannt werden können.

(iii) Die Selektion gegen intakte Zellen (in Anwesenheit endogener Nukleasen) bevorzugt diejenigen Aptamere, die aufgrund ihrer Struktur gegenüber enzymatischem Verdau unempfindlich sind. Folglich sollten selektierte Aptamere ohne weiteres rationales Design (zur Erhöhung ihrer Lebensdauer) für Tests mit biologischem Material geeignet sein.

4.3 Wahl der Nukleinsäurebibliothek – RNA- oder DNA-SELEX

Sowohl die RNA- als auch die DNA-SELEX-Prozedur haben Vor- und Nachteile. Neben der in Kap. 2.1 beschriebenen Unterschiede in der Selektionsprozedur unterscheiden sich RNA- und DNA-Aptamere im wesentlichen durch ihre unterschiedliche Stabilität gegenüber enzymatischem Verdau und im Grad ihrer Modifizierbarkeit. Dieses Kapitel soll die Kriterien zusammenfassen, die den Ausschlag zur Verwendung der ssDNA-SELEX-Prozedur gegeben haben.

Sowohl ssDNA als auch natürliche oder modifizierte RNA sind durch die Ausbildung intramolekularer Basenpaarung in der Lage, zu gleichermaßen thermisch stabilen 3-dimensionalen Strukturen zu falten. Auch in puncto Bindungsspezifität und Affinität unterscheiden sich ssDNA- und RNA-Aptamere nicht nennenswert. Die Stabilität gegenüber enzymatischem Verdau durch Endonukleasen ist bei natürlicher RNA im Vergleich zu ssDNA jedoch deutlich geringer, modifizierte RNA ist diesbezüglich am stabilsten (32). Während natürliche RNA in Serum oder in Zellen eine Überlebensdauer von nur wenigen Minuten aufweist (103) kann modifizierte RNA (enthält Pyrimidinbasen mit 2'-Amino-, 2'-Fluoro-

oder 2'-Bromo- Resten) gegenüber enzymatischen Verdau als nahezu resistent betrachtet werden (104). Die Nuklease-Resistenz von ssDNA liegt zwischen der von natürlicher RNA und modifizierter RNA. Ihre Resistenz ist jedoch stark von der Sekundär- und Tertiärstruktur der ssDNA abhängig (105). Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass die Inkubation der ssDNA-Bibliothek mit den zellulären Zielstrukturen, ausschließlich zum Erhalt von Aptameren mit ausreichender Stabilität gegenüber enzymatischem Verdau führt (enzymatisch labile Aptamere werden während der Inkubation mit den Endothelzellen degradiert und können per PCR nicht verstärkt werden). Der künstliche Selektionsdruck des *in vitro* Evolutionsprozesses gegen ganze Zellen beinhaltet konsequenterweise nicht nur die Affinität bezüglich Endothelzellen, sondern implementiert auch die Resistenz gegenüber endogenen Nukleasen. Von Aptameren die aus der Selektionsprozedur gegen ganze Zellen letztendlich hervorgehen kann somit angenommen werden, dass sie für die Zeitdauer diagnostischer Tests mit biologischem Material (mit Zellkulturen und auf Kryostat-Gewebeschnitten) ausreichend stabil und somit funktionell bleiben.

Tab. 1. Vor- und Nachteile von ssDNA- bzw. RNA-Aptameren (**Fehler! Textmarke nicht definiert.**)

	ssDNA	natürliche RNA	modifizierte RNA
Thermische Stabilität	+	+	+
Spezifität und Affinität gegenüber der Zielstruktur	+	+	+
Nukleaseresistenz	+	-	++
Markierung mit Reportermolekül an definierter Stelle	++	-	-
Anzahl der Schritte im SELEX-Prozess	+	-	-

(++) sehr gut, (+) gut, (-) schlecht

DNA-SELEX hat im Vergleich zu RNA-SELEX bezüglich der beabsichtigten fluoreszenzkontrollierten Anreicherung einen weiteren entscheidenden Vorteil: Die ssDNA-SELEX-Prozedur erlaubt durch Einbau eines fluoreszenzmarkierten Primers während des PCR-Verstärkungsschrittes den Erhalt von identisch fluoreszenzmarkierten und somit direkt miteinander vergleichbaren Aptameren (106). Beim RNA-SELEX-Prozess ist der Einbau eines Fluoreszenzmarkers an einer vordefinierten Stelle im RNA-Strang nicht möglich.

4.4 Selektionsbedingungen

4.4.1 Selektion unter physiologischen Bedingungen

Im Hinblick auf die von den Aptameren zu bewerkstelligende Aufgabe, nämlich ihre Zielstruktur sowohl auf intakten Zellen als auch auf nativen Kryostat-Gewebeschnitten zu erkennen und zu binden wurden die Selektionsbedingungen an physiologische Bedingungen angenähert. Es wurde ein Selektionspuffer gewählt dessen Zusammensetzung sich in der Durchflusszytometrie und Gewebehistologie bewährt hat (50 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 100 mM NaCl). Dem Puffer (physiologischer pH 7.4) wurde zur Inhibierung der Nuklease und Proteinase Aktivität 0.1% NaN₃, und zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des Aptamers eine physiologische Konzentration von MgCl₂ (0.1 mM) zugesetzt (Mg²⁺ kann sowohl die Phosphatgruppen der ssDNA und den Guaninbasen miteinander vernetzen und trägt somit zur Stabilisierung des Aptamers bei, siehe S. 8, Abb. 1). Die Selektion erfolgte in Selektionspuffer durch Inkubation der ssDNA-Bibliotheken mit SV-40 transformierten Endothelzellen (YPEN-1) im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂). Die Dauer der Inkubation betrug in Anlehnung an vorangegangene SELEX-Experimente 30 min.

4.4.2 Behandlung der zellulären Zielstrukturen

Aufgrund der schlechten Membrangängigkeit von Nukleinsäuren (107, 108) haben Zelloberflächenprotein-bindende Aptamere das größte funktionelle Potenzial. In den Blutstrom applizierte Aptamere könnten ihre Zielstruktur auf den Endothelzellen der Blutgefäße erkennen und an sie binden ohne Blut-Gewebebarrieren überwinden zu müssen. Zum Erhalt der Oberflächenproteine der endothelialen Zielstrukturen wurden die auf dem Boden der Zellkulturflasche adhärent wachsenden Endothelzellen vor der Inkubation mit den Aptamerbibliotheken nicht mittels Trypsin, sondern mit einem Zellschaber abgelöst (die Proteinase Trypsin, die üblicherweise zum Ablösen adhärenter Zelllinien verwendet wird, würde endotheliale Oberflächenproteine degenerieren und sie somit als Zielstruktur unbrauchbar machen).

Die quantitative und qualitative Expression von proliferations-assoziierten Proteinen ist abhängig vom Zustand der Zellen (102) und kann u. a. abhängig von der Passage, der Zellkulturdauer, sowie der Zelldichte stark variieren. In Endothelzellkulturen die eine gewisse Dichte (Konfluenz) erreicht haben, inhibieren sich benachbarte Zellen durch Kontaktinhibition gegenseitig in ihrer Zellteilungsrate. Der endotheliale Phänotyp einer subkonfluenten Endothelzelllinie ändert sich bei Erreichen eines konfluenten Zustandes

dahingehend, dass die Produktion von Proteinen durch die sich proliferierende von ruhenden Endothelzellen unterscheiden, gedrosselt, oder ganz eingestellt wird. Diese proliferations-assoziierten, differenziell exprimierten Proteine sind jedoch bevorzugte Adressen zur Diagnostik der aktivierten Mikrovaskulatur in Tumoren und entzündlichen Regionen des Rattenhirns. Aus diesem Grund wurden ausschließlich subkonfluente Kulturen verwendet.

Zur Beurteilung der relativen Fluoreszenzzunahme in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionsrunden (Anreicherungskontrolle) ist ein konstanter Status der Proteinexpression Voraussetzung. Die verwendeten Endothelzellkulturen jeder Selektionsrunde wurden deswegen unter identischen Bedingungen kultiviert. Die Endothelzell-Zielstrukturen aller Selektionszyklen stammen aus der selben Passage. Zur Selektion von Aptameren wurden 2×10^5 YPEN-1 Endothelzellen in Kultur genommen und nach 48 h in subkonfluentem Zustand durch Ablösen mit einem Zellschaber geerntet.

5 Reduktion der Koselektion irrelevanter Nukleinsäuren

Es gibt drei Arten von Nukleinsäuren deren Koselektion im Laufe des SELEX-Prozesses vermieden werden sollte (32): (i) ssDNA die keine Zielstruktur erkennt, sich jedoch aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung unspezifisch an die Zellen anlagert (Hintergrundbindung), (ii) ssDNA Aptamere, welche zelluläre Strukturen spezifisch erkennen, die nicht ausschließlich von Endothelzellen sondern auch von anderen Zelltypen „präsentiert“ werden, und (iii) ssDNA Aptamere, die an Oberflächenstrukturen der Separationsmatrix binden. Diese drei Typen „irrelevanter Nukleinsäuren“ würden ohne geeignete Gegenmaßnahmen im Laufe der Selektionszyklen angereichert werden und schließlich in der Bibliothek der letzten Selektionsrunde dominieren. Der prozentuale Anteil an funktionellen Aptameren (endotheliale Zielstrukturen erkennende Aptamere) in der Bibliothek der letzten Selektionsrunde wäre gering und inmitten der Masse „irrelevanter Nukleinsäuren“ nur durch zeit- und kostenintensive Testung einer immensen Anzahl von Nukleinsäuren zu identifizieren.

5.1 Reduktion der Hintergrundbindung

Zur Unterdrückung der unspezifischen Anlagerung amplifizierbarer Nukleinsäuren (ssDNA aus den Bibliotheken mit den zur PCR-Amplifizierung notwendigen Primer-Bindungsstellen) wurden nicht amplifizierbare Nukleinsäuren (Hefe-tRNA) und Rinderserum (Bovine Serum

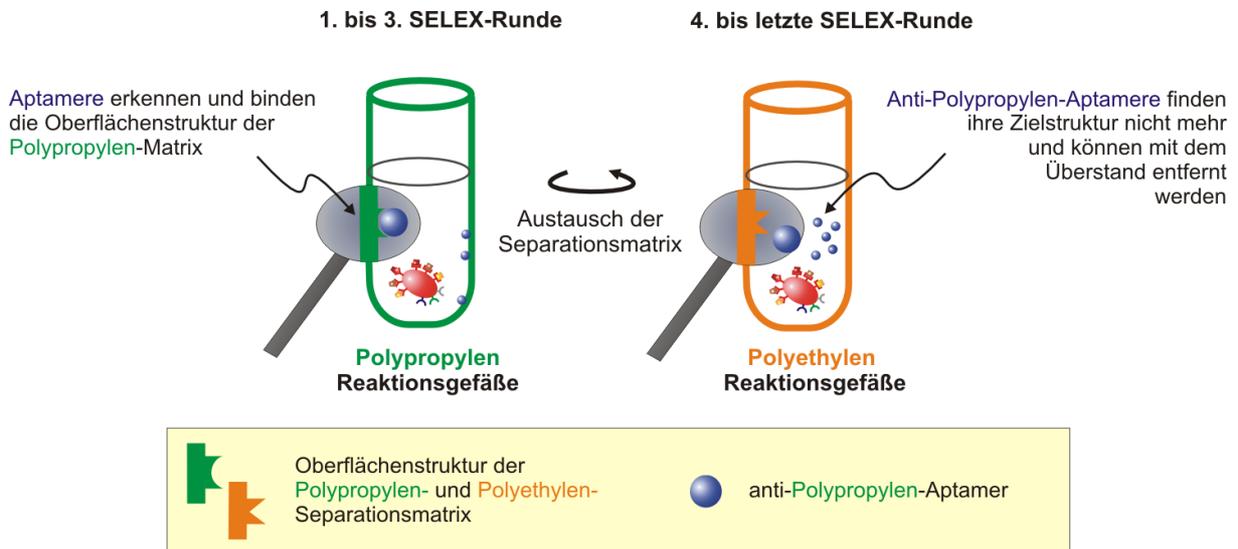
Albumin, BSA) verwendet. Diese Kompetitoren lagern sich auf der Zelloberfläche ab und reduzieren dadurch die unspezifische Ablagerung amplifizierbarer ssDNA. Spezifisch an zelluläre Zielstrukturen bindende Aptamere können jedoch aufgrund ihrer größeren Affinität nicht verdrängt werden (109). Zur Unterdrückung des unspezifischen Hintergrundes wurde ein 5-fach molarer Überschuss an Hefe-tRNA und ein 5-fach molarer Überschuss an BSA dem Reaktionsansatz zugegeben. Die Separation von zellgebundener ssDNA von freier ssDNA erfolgte durch Zentrifugation. Der Überstand mit ungebundener ssDNA konnte entfernt werden, das Zentrifugat bestehend aus Endothelzell-Aptamer-Komplexen wurde zur weiteren Reduktion der Hintergrundbindung noch dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer (Selektionspuffer mit 0.2% BSA) gewaschen.

5.2 Reduktion von Separationsmatrix-bindenden Aptameren

In Experimenten zur Selektion von Aptameren gegen freie Proteine in Lösung wird zur Trennung von Protein-gebundenen und freien Nukleinsäuren das Inkubationsgemisch üblicherweise durch Nitrozellulosemembranen oder Sepharose filtriert (110). Protein-Aptamer-Komplexe werden von der Separationsmatrix festgehalten und freie ssDNA kann durch Waschen entfernt werden. Aptamere, welche die Oberflächenstruktur der Nitrozellulose- bzw. Sepharose-Matrix erkennen und fest binden, können durch Waschen jedoch nicht entfernt werden. Sie würden ungewollt im Zuge der anschließenden PCR verstärkt und im Laufe des Selektionsprozesses angereichert werden. Aus diesem Grund werden Separationsmatrix-bindende Aptamere vor Beginn der eigentlichen Selektion üblicherweise durch Präinkubation der Bibliotheken mit dem Material der Separationsmatrix aus dem Selektionsprozess entfernt.

Bei der Selektion gegen ganze Zellen konnten zellgebundene Aptamere von freien Aptameren durch Zentrifugation voneinander getrennt werden. In diesem Fall stellte die Oberflächenstruktur der Reaktionsgefäße die Separationsmatrix dar. Aptamere, die fest an die Oberfläche des Reaktionsgefäßes binden, könnten im anschließenden Waschschrift jedoch ebenfalls nicht entfernt werden: Es bestünde die Gefahr ihrer „Verschleppung“ und Anreicherung in den Bibliotheken der folgenden Selektionsrunden. Zur effektiven Eliminierung von Aptameren, die spezifisch an die Polypropylenmatrix der Reaktionsgefäße banden (in denen Selektion durch Inkubation der Bibliotheken mit den Endothelzellen und anschließende Separation freier ssDNA durch Zentrifugation stattfand), wurden die Polypropylengefäße nach der dritten Selektionsrunde durch Polyethylenreaktionsgefäße

ersetzt (Schema 9). Bis zur dritten Selektionsrunde möglicherweise angereicherte anti-Polypropylen-Aptamere konnten in den Polyethylengefäßen ihre Zielstruktur nicht mehr finden und somit nach der Zentrifugation mit dem Überstand entfernt werden.



Schema 9. Eliminierung von Separationsmatrix-bindenden Aptameren durch Wechsel des Materials der Separationsmatrix

5.3 Reduktion von endothelzell-unspezifischen Aptameren

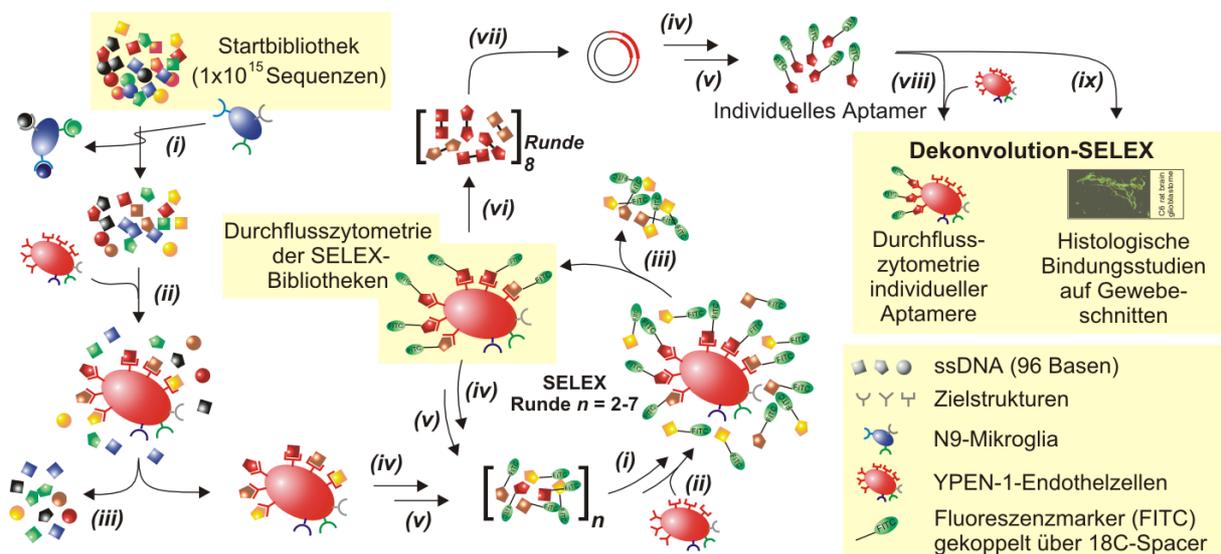
Die Koselektion von Aptameren, die an endothel-unspezifische Zielstrukturen binden (z.B. Glykoproteine, Ionenkanäle oder sonstige auf vielen oder allen Zelltypen vorhandenen Strukturen), wurde durch Präinkubation sowohl der Startbibliothek als auch der Bibliotheken aller folgenden Selektionsrunden mit N9-Mikrogliazellen reduziert. Die gebildeten Mikroglia-Aptamer-Komplexe wurden durch Zentrifugation aus dem Selektionsprozess entfernt. Dieser Schritt wird unter 6.2.1 genauer beschrieben.

6 Systematische Evolution von Aptameren zur Diagnose pathologischer Mikrovaskulatur

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit soll die gesamte Selektionsprozedur zunächst in groben Zügen vorgestellt werden. Details werden an geeigneter Stelle in den Kapiteln 6.2 – 6.5 näher erläutert.

6.1 Die Selektionsprozedur in der Übersicht

Zur Reduktion der Koselektion von Aptameren, die neben Endothelzellen auch spezifisch an andere Zelltypen binden, wurde (i) die ssDNA-Startbibliothek zunächst mit N9-Mikrogliazellen gegenselektiert und die Mikroglia-Aptamer-Komplexe aus dem Selektionszyklus entfernt.



Schema 10. Schematische Übersicht der systematischen *in vitro*-Evolutions-Prozedur zur Erzeugung von Aptameren zur Diagnose der aktivierten Mikrovaskulatur des pathologischen Rattenhirns

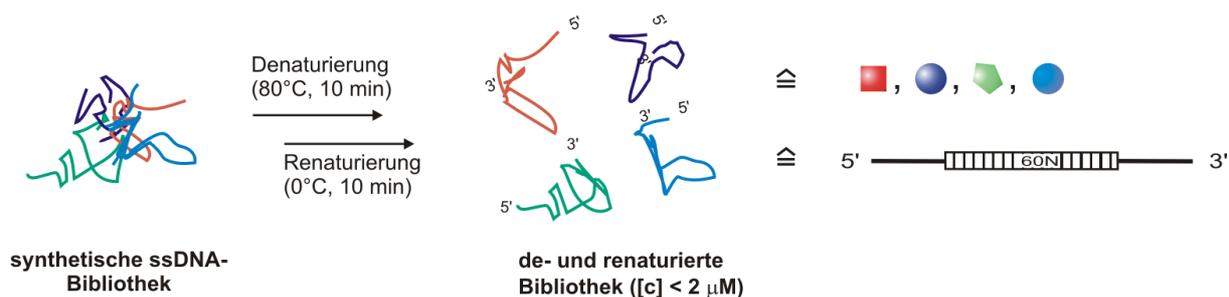
(ii) Die gegenselektierte Bibliothek wurde mit YPEN-1-Endothelzellen inkubiert und (iii) ungebundene ssDNA aus dem Selektionszyklus entfernt. Endothelzell-gebundene Aptamere wurden (iv) mittels PCR verstärkt und mit einem Fluoreszenzreportermolekül markiert. (v) Der Aptamerstrang des doppelsträngigen PCR-Produktes wurde vom Matrizenstrang getrennt und die daraus resultierende fluoreszenzmarkierte ssDNA-Bibliothek der zweiten SELEX-Runde erneut durch (i) Inkubation mit N9-Mikroglia gegenselektiert. Die gegenselektierte Bibliothek wurde wiederum (ii) mit YPEN-1-Endothelzellen inkubiert. (iii) Ungebundene Nukleinsäuren wurden entfernt und die Endothelzellbindung der fluoreszenzmarkierten Aptamere am Durchflusszytometer analysiert. Insgesamt wurden acht Zyklen von Selektion

und Amplifikation durchgeführt und die relativen gemessenen Fluoreszenzintensitäten jeder Selektionsrunde zur Beurteilung des Anreicherungsprozesses miteinander verglichen. (vii) Die angereicherte Bibliothek der achten Selektionsrunde wurde durch Klonierung in einzelne Aptamere sortiert. Ausgehend von den einzelnen Plasmiden wurden individuelle Aptamere (iv) mittels PCR, gefolgt von (v) der Isolierung des fluoreszenzmarkierten Aptamerstranges hergestellt. Zur Identifizierung von Aptameren mit der Fähigkeit, selektiv die aktivierte Mikrovaskulatur des pathologischen Rattenhirns zu erkennen, wurde eine Dekonvolution-SELEX-Prozedur bestehend aus zwei Schritten durchgeführt: (viii) Erster Schritt: Evaluierung ihrer relativen Endothelzell-Affinität. (ix) Zweiter Schritt: Evaluierung ihrer Endothelzell-Selektivität.

6.2 Die erste Selektionsrunde

6.2.1 Vorbereitung der Bibliothek und Gegenselektion

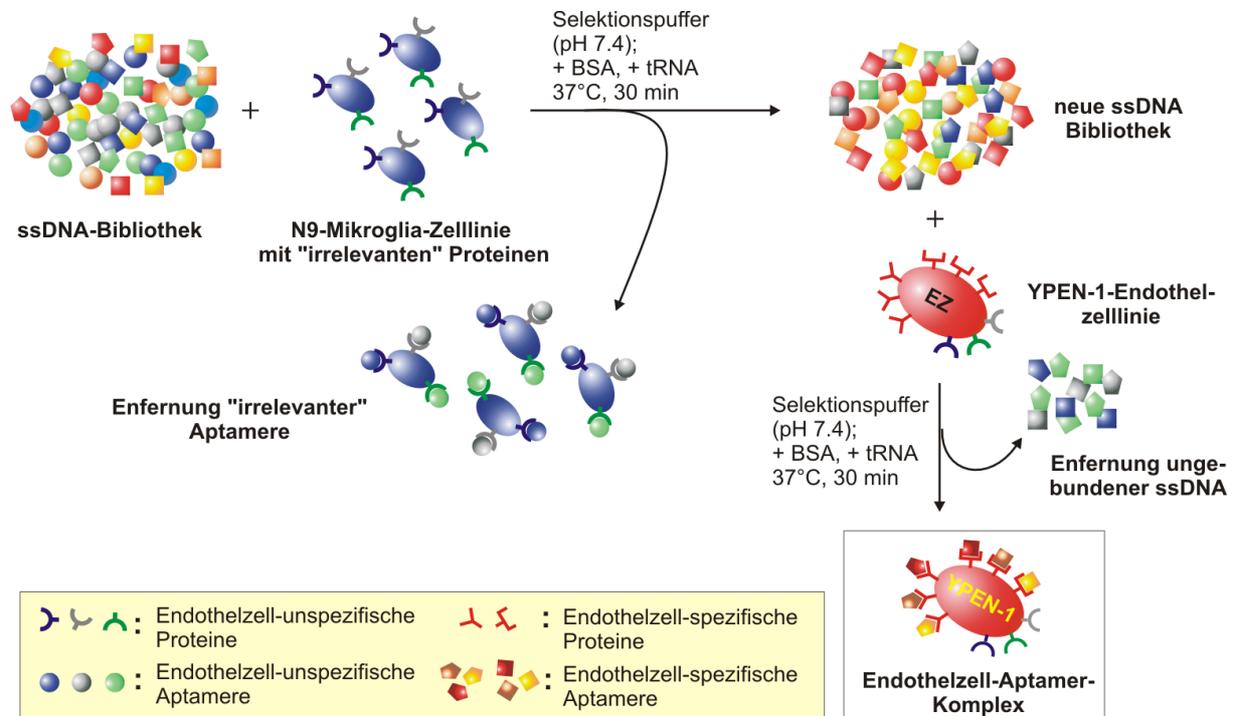
Liegt die maximale Konzentration der Bibliothek unter $2 \mu\text{M}$, dann haben individuelle ssDNA-Moleküle ausreichend Abstand zu den Nachbarmolekülen, um während des Renaturierungsschrittes die intramolekulare Ausbildung von Basenpaaren der intermolekularen vorzuziehen (32). Zur Ermöglichung der effektiven Ausbildung potenzieller Aptamerstrukturen wurde eine Startbibliothek mit 1×10^{15} -Sequenzen in 1 ml Selektionspuffer ($1.6 \mu\text{M}$) für eine Dauer von 10 min bei 80°C denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis renaturiert.



Schema 11. Vorbereitung der ssDNA-Bibliothek

Zur Abreicherung von Endothelzell-unspezifisch-bindenden Aptameren wurde zunächst mit N9-Mikrogliazellen (111) inkubiert (Schema 12). Die verwendeten N9-Mikrogliazellen (eine monozytäre Zelllinie des Rattenhirns) wurden zur effektiven Gegenselektion in großem Überschuss eingesetzt (ca. 3×10^7 Zellen). Das Ernten der Mikroglia-Zelllinie erfolgte wie das der YPEN-1-Endothelzelllinie durch Ablösen mit einem Zellschaber. Die Gegenselektion erfolgte unter Zellkulturbedingungen mit einem jeweils 5-molarem Überschuss an Hefe-

tRNA- und BSA-Kompetitor in Selektionspuffer. Mikroglia-Aptamer-Komplexe wurden abzentrifugiert und der die gegenselektierte Bibliothek enthaltende Überstand mit 1×10^6 YPEN-1-Endothelzellen inkubiert.



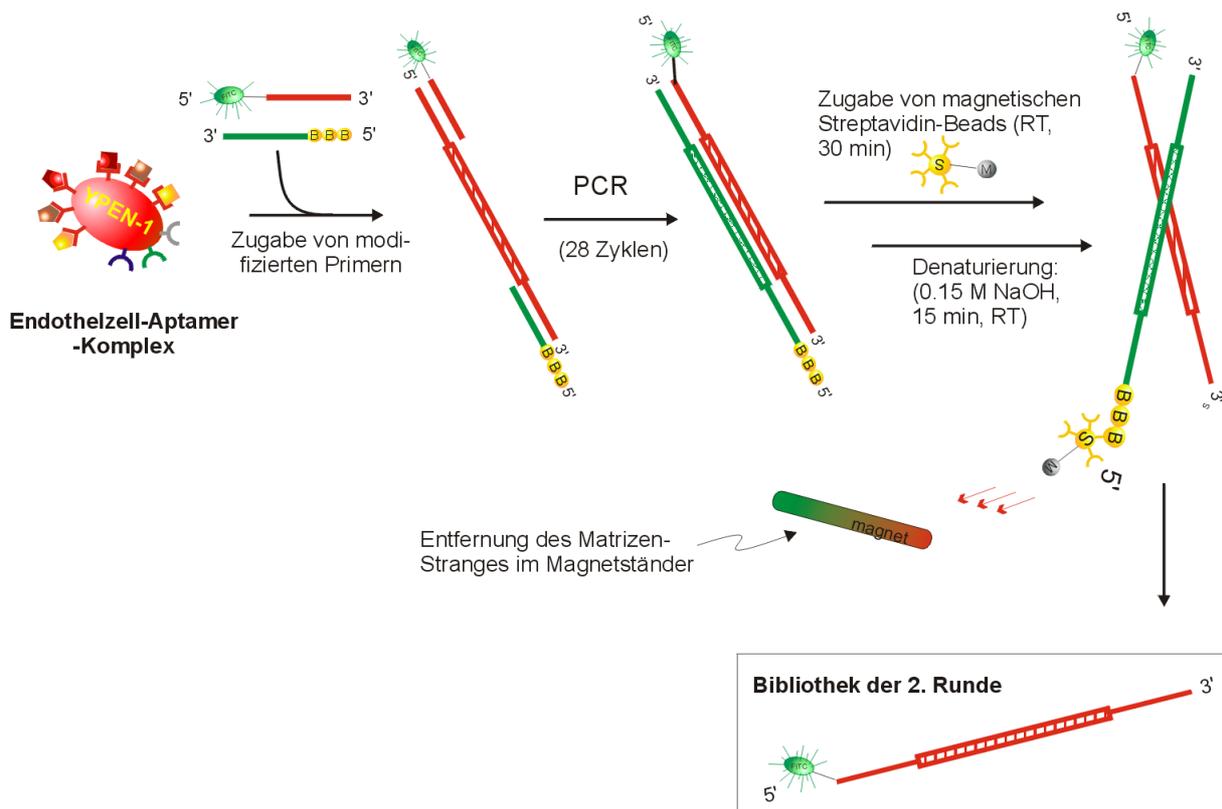
Schema 12. Reduktion von Aptameren gegen Endothelzell-unspezifische Proteine

6.2.2 Herstellung fluoreszenzmarkierter Aptamerbibliotheken

Zur Herstellung von 5'-fluoreszenzmarkierten Aptameren wurden für die PCR zwei modifizierte Primer eingesetzt: ein Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) markierter 3'-Primer und ein 3-fach biotinylierter (trB) 5'-Primer. Das FITC-Reportermolekül wurde zur Verstärkung der effektiven Fluoreszenzintensität mittels eines 18 Kohlenstoff-Ethylen-Glycol-Platzhalters (18C) am 5'-Ende platziert (112). Der Fluoreszenzmarker wurde aus zwei Gründen schon im Laufe der Selektion eingeführt: (i) Die Herstellung von fluoreszenzmarkierten Bibliotheken sollte in Kombination mit zellulären Zielstrukturen eine Anreicherungskontrolle am Durchflusszytometer erlauben und somit die bis dato übliche radioaktive Anreicherungskontrolle ersetzen. (ii) Die nachträgliche Markierung eines Aptamers – welches ohne Fluoreszenzmarkierung selektiert wurde – kann zur Änderung seiner 3-dim. Struktur und somit zum Verlust seiner Bindungsfähigkeit führen (113).

Üblicherweise werden Aptamer- und biotinylierter Matrizenstrang mittels Gelelektrophorese auf denaturierendem Polyacrylamidgel voneinander getrennt (54). Aus Gründen großer

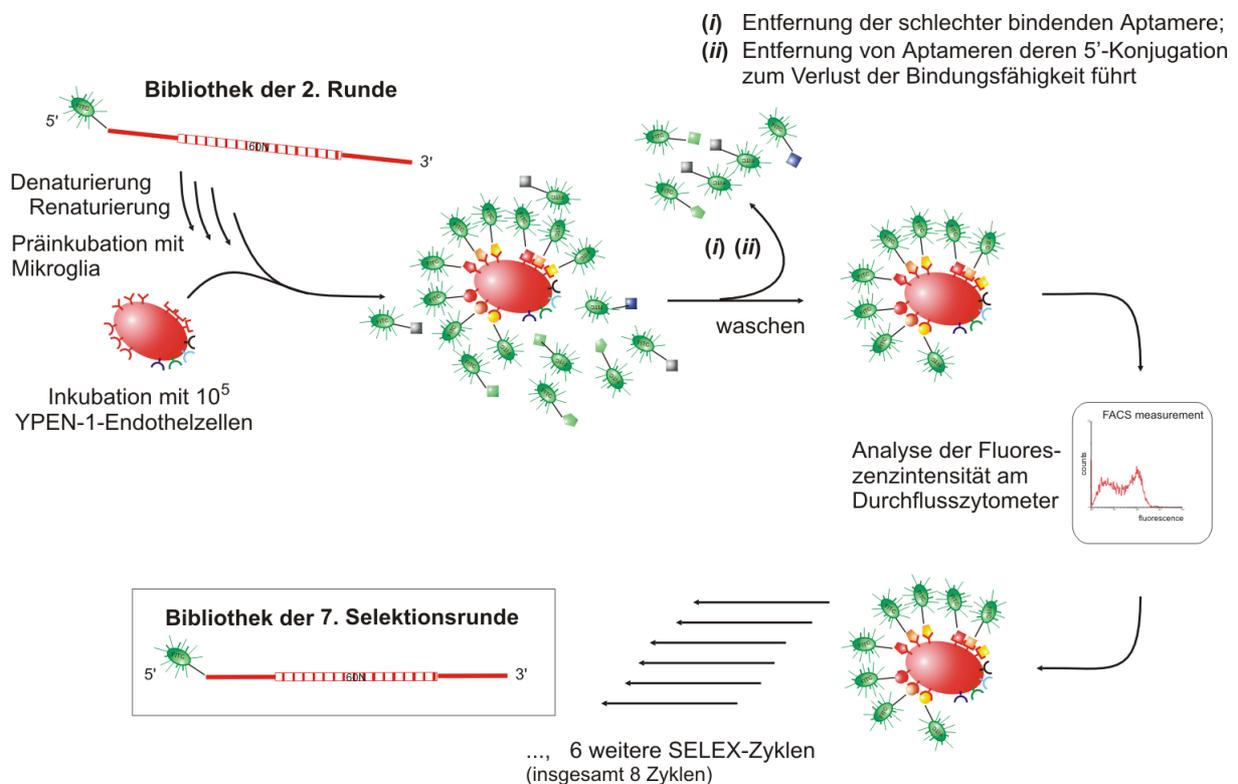
Ausbeute- und Fluoreszenzaktivitätsverluste bei der Isolierung des FITC-markierten Aptamers aus dem Polyacrylamidgel wurden zur Isolierung des Aptamerstranges schließlich Streptavidin-beschichtete Kügelchen (Dynabeads[®]-M-280-Streptavidin) eingesetzt. Das Streptavidin der magnetischen Kügelchen bindet dabei den Biotinrest des doppelsträngigen PCR-Produktes, sodass die beiden Stränge des PCR-Produktes nach Denaturierung in 0.15 M NaOH in einem Magnetständer voneinander getrennt werden konnten. Die hochaffine Streptavidin-Biotin-Bindung ($K_d = 10^{-15}$) wurde unter den alkalischen Bedingungen nicht zerstört. Der magnetische Matrizenstrang wurde im Magnetständer fixiert und der alkalische Überstand mit den fluoreszenzmarkierten Aptameren konnte nach Neutralisation als Bibliothek für die nächste Selektionsrunde eingesetzt werden. Die Strangtrennung erfolgte innerhalb eines Bruchteils der Zeit (ca. 45 min) einer Gelextraktion, Ausbeute- und Fluoreszenzaktivitätsverluste waren gering.



Schema 13. Isolierung des fluoreszenzmarkierten Aptamerstranges aus dem dsDNA-PCR-Produkt

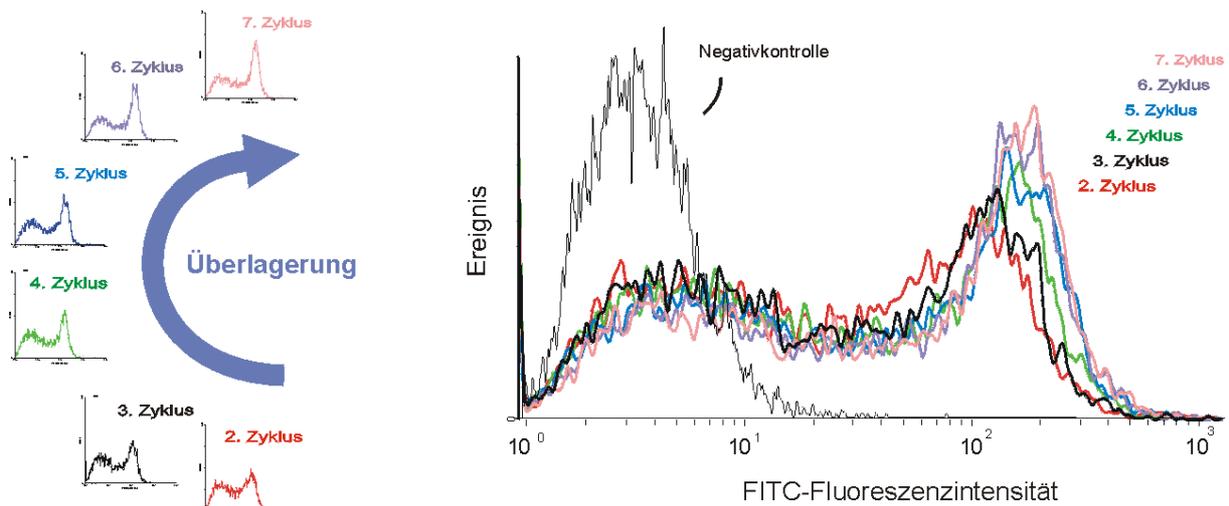
6.3 Zweite bis siebte Selektionsrunde

Die fluoreszenzmarkierte Bibliothek der zweiten Selektionsrunde wurde analog der ersten Runde mit 3×10^7 Mikrogliazellen präinkubiert. Zur Erhöhung des Selektionsdruckes wurde ab der zweiten Selektionsrunde jedoch nur noch mit 1×10^5 YPEN-1-Endothelzellen inkubiert. In diesem Schritt scheiden diejenigen Aptamere aus, die (i) den Wettkampf um die freien Bindungsplätze gegen die affineren Liganden verlieren. (ii) Da in der ersten Selektionsrunde unmarkierte ssDNA-Liganden selektiert wurden, scheiden an dieser Stelle auch Aptamere aus, deren 5'-Konjugation mit dem FITC-18C-Reportermolekül zum Verlust ihrer Bindungsfähigkeit führt. Die angewandte Selektionsmethode ermöglicht somit ausschließlich die Selektion von Aptameren, deren Struktur und somit Funktionalität von der Modifikation am 5'-Ende unabhängig ist (Aptamere binden sowohl ohne 5'-Modifikation (1. Runde) als auch mit 5'-Modifikation (2.–7. Selektionsrunde)). Die Bindungsfähigkeit der Aptamere sollte durch diese Maßnahme auch mit anderen Typen von 5'-Modifikationen gewährleistet bleiben. Die Fluoreszenzintensität der FITC-18C-markierten Aptamer-Endothelzell-Komplexe wurden in der zweiten und in den folgenden Selektionsrunden am Durchflusszytometer analysiert.



Schema 14. Zweite bis siebte Selektionsrunde der fluoreszenzkontrollierten SELEX-Prozedur gegen ganze Endothelzellen

Zur Beurteilung der Anreicherung von Endothelzell-bindenden, fluoreszenzmarkierten Aptameren in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionsrunden wurden die ermittelten Fluoreszenzintensitäten durch Überlagerung ihrer Histogramme miteinander verglichen. Als Negativkontrolle (zur Berücksichtigung der unspezifischen Hintergrundbindung) diente unselektierte, FITC-18C-markierte ssDNA aus der Startbibliothek.



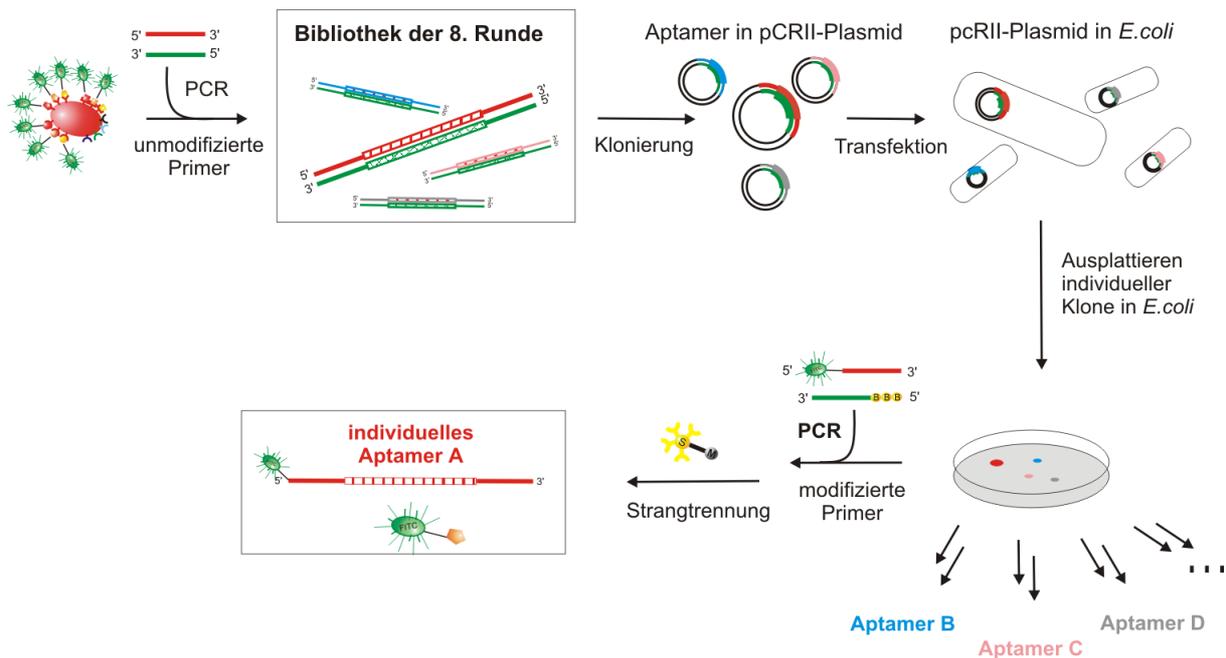
Schema 15. Anreicherungskontrolle von fluoreszenzmarkierten Aptameren in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionszyklen

Das Histogramm der zweiten Selektionsrunde (Schema 15, rot) zeigte bereits im zweiten Selektionszyklus eine deutliche Verschiebung in Richtung größerer Fluoreszenzintensität. Die kontinuierliche Verschiebung der Histogramme der SELEX-Zyklen 3–7 signalisierte eine langsame, aber kontinuierliche Anreicherung Endothelzell-bindender Aptamere in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionsrunden. Das Histogramm des siebten Selektionszyklus zeigte im Vergleich zum sechsten Zyklus keine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Der *in vitro* Evolutionsprozess wurde somit gestoppt und individuelle Aptamere aus der resultierenden Bibliothek der achten Selektionsrunde isoliert.

6.4 Sortierung in einzelne Klone

Die PCR zur Herstellung der Bibliothek der achten Selektionsrunde erfolgte unter Einsatz von unmodifizierten Primern. Die doppelsträngigen PCR-Produkte wurden jeweils in ein pCRII-Plasmid kloniert, dieses in *E. coli* transformiert und schließlich auf Nährboden ausplattiert. Einzelne Bakterienkolonien (jede Kolonie enthält Aptamere einer definierten Sequenz) wurden isoliert und ihre Plasmide zur Herstellung individueller fluoreszenzmodifizierter

Aptamere verwendet (PCR mit modifizierten Primern, gefolgt von Dynabeads[®]-vermittelter Strangtrennung).



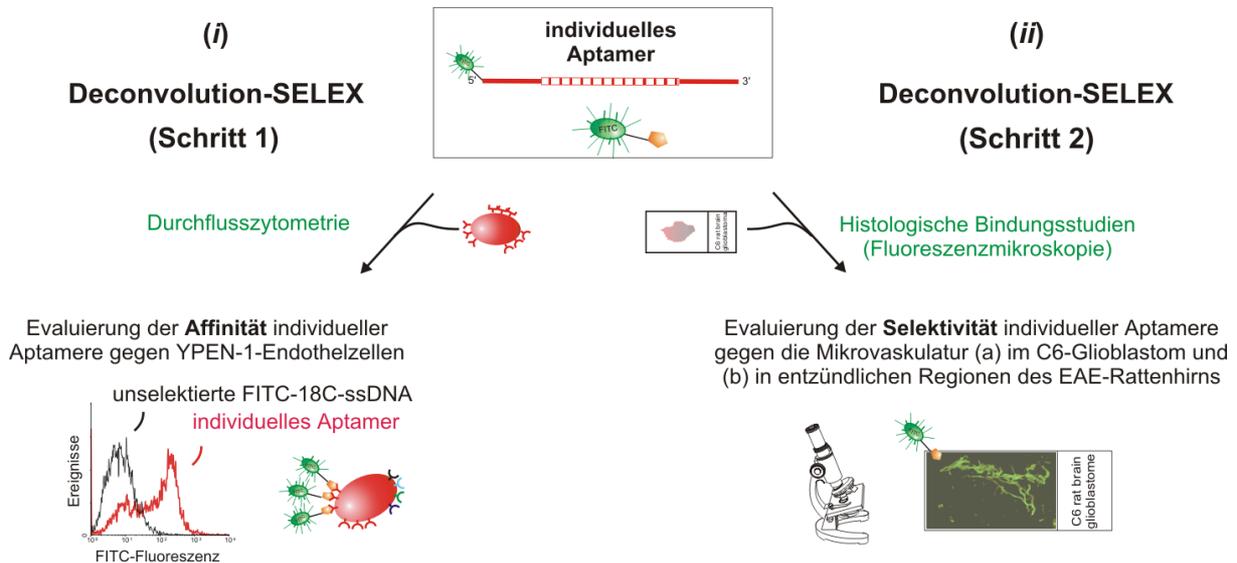
Schema 16. Sortierung von Aptameren der Bibliothek der achten Selektionsrunde in einzelne Klone

6.5 Dekonvolution-SELEX

Die effektive Nutzbarkeit der Komplex-SELEX-Prozedur ist stark von einer Methode abhängig, die es ermöglicht – innerhalb der angereicherten Bibliothek der letzten Selektionsrunde –, einzelne Aptamere zu identifizieren, die gegen molekulare Zielstrukturen der komplexen Zelle gerichtet sind, welche im Kontext des zu untersuchenden Systems von Interesse sind (96). Im Falle der vorliegenden Arbeit war die Nutzbarkeit einzelner Aptamerliganden der angereicherten Bibliothek somit von einer Methode abhängig, die es erlaubte, gegen molekulare Adressen des aktivierten Endothels gerichtete Aptamere zu identifizieren. Die Aptamerliganden sollten dabei selektiv aktivierte Mikrogefäße auf Gewebeschnitten visualisieren und somit von ruhenden Endothelzellen in gesundem Gewebe unterscheidbar machen. Individuelle fluoreszenzmarkierte Aptamere, die diese Kriterien erfüllen, wurden aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde durch eine Dekonvolution-SELEX-Prozedur in zwei Schritten identifiziert (Schema 17):

(i) Zur Evaluierung der Affinität einzelner FITC-18C-markierter Nukleinsäuren wurde ihre Bindungsfähigkeit gegen YPEN-1-Endothelzellen durchflusszytometrisch analysiert.

(ii) Die Bindungsselektivität einzelner Aptamere bezüglich der pathologischen Mikrovaskulatur des Rattenhirns wurde durch histologische Färbung sowohl von (a) C6-Glioblastom- als auch von (b) EAE-Gewebeschnitten untersucht.



Schema 17. Dekonvolution-SELEX-Prozedur zur Identifizierung von Aptameren gegen molekulare Adressen der aktivierten Mikrovaskulatur

6.5.1 Dekonvolution-SELEX (Schritt 1) – durchflusszytometrische Evaluierung der Endothelzell-Bindung individueller ssDNA-Polynukleotide

Zur Identifizierung individueller Endothelzell-bindender Aptamere wurden 1×10^5 YPEN-1-Endothelzellen mit 200 pmol fluoreszenzmarkierter ssDNA in Selektionspuffer inkubiert (37°C, 30 min, jeweils 5-molarer Überschuss an Hefe-tRNA und BSA-Kompetitor). Die Endothelzell-Nukleinsäurekomplexe wurden gewaschen und ihre Fluoreszenzintensitäten am Durchflusszytometer gemessen. Der Vergleich mit Endothelzellen – gefärbt mit unselektierter ssDNA (FITC-18C-96-nt) – erlaubte die Identifizierung Endothelzell-bindender Aptamere.

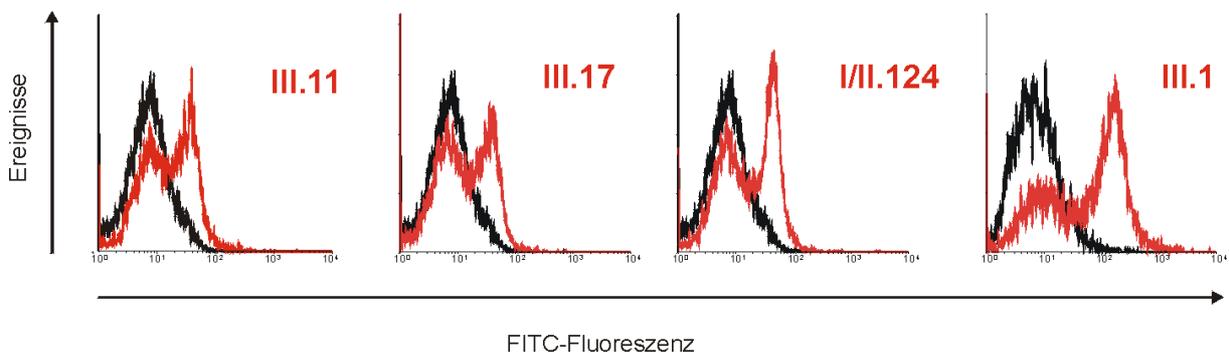


Abb. 4. Dekonvolution-SELEX (Schritt 1): Bestimmung der relativen Endothelzell-Affinität von Aptameren mittels Durchflusszytometrie

Repräsentativ für insgesamt 52 untersuchte ssDNA-Sequenzen zeigt Abb. 4 die vier Histogramme der Aptamere III.11; III.17; I/II.124 und III.1 (rote Kurve). Die Verschiebung ihrer Histogramme in Richtung größerer Fluoreszenzintensität (verglichen mit unselektierter ssDNA; schwarze Kurve) zeigten ihre Fähigkeiten, endotheliale Zielstrukturen zu erkennen und somit als Endothelzell-bindendes Aptamer zu fungieren. Die Histogramme der 52 getesteten Aptamere sind in Kap 3 des Experimentellen Teils aufgeführt.

6.5.2 Dekonvolution-SELEX (Schritt 2) – histologische Evaluierung der Endothelzell-selektivität individueller Aptamere auf Gewebeschnitten

Aptamere, die im ersten Dekonvolution-SELEX-Schritt als „Endothelzell-Binder“ identifiziert werden konnten, wurden in einem zweiten Dekonvolution-SELEX-Schritt einer Selektivitätskontrolle unterzogen. Durch histologische Färbung von Gewebeschnitten des Rattenhirns wurden diese Aptamere direkt bezüglich ihrer letztendlich zugeordneten Aufgabe – nämlich als neuartiger histologischer Marker zu fungieren – getestet.

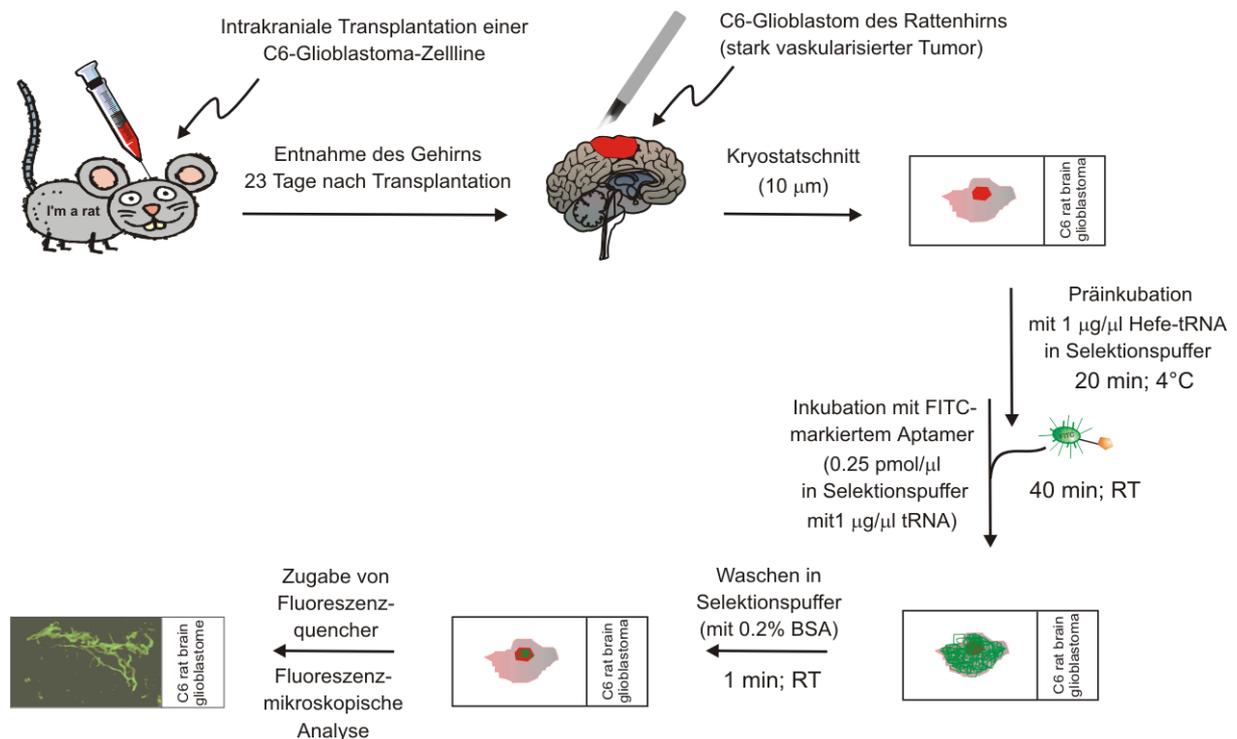
Native (unfixierte) Gewebeschnitte einer definierten Pathologie spiegeln – durch die Anwesenheit sämtlicher pathologie-assoziiertes Zelltypen und Faktoren – nahezu *in vivo*-Bedingungen dieser Erkrankung wider. Die durchgeführte Selektivitätskontrolle von Aptameren auf Gewebeschnitten des experimentellen C6-Glioblastom-Tiermodells bzw. des Tiermodells der EAE verlief somit in Annäherung an *in vivo*-Bedingungen solider Hirntumoren bzw. von entzündlichen Erkrankungen des ZNS (EAE, MS).

6.5.2.1 Evaluierung der Aptamerselektivität gegen die aktivierte Mikrovaskulatur im C6-Glioblastom des Rattenhirns

Das Tiermodell des experimentellen C6-Glioblastoms des Rattenhirns wurde im Wesentlichen aufgrund der mikroskopischen Charakteristika von Glioblastom-Hirntumoren gewählt (10): Für das Glioblastom charakteristisch sind u.a. ihre starke Neovaskularisierung, die hohe Zelldichte und ihre häufig glomeruloiden Endothelzell-Proliferate. Diese Proliferate sind an der Grenze zum „normalen“ Hirngewebe oft besonders markant, da der Tumor im Zuge seines Wachstums mehr und mehr vom umgebenden Hirngewebe des „Normalhirns“ an seiner räumlichen Ausdehnung gehindert und dadurch vor allem in seinen Randbereichen komprimiert wird. Damit verbunden ist auch eine erhöhte Dichte der neugebildeten Tumormikrogefäße an der Grenze zum peritumoralen Hirngewebe. Gefäße in Grenzregionen

von Glioblastomen sollten somit besonders deutlich zu visualisieren sein und Tumor- und Normalgewebe unterscheidbar machen.

Das C6-Glioblastoma Modell hat somit das Potential (i) zur Diskriminierung zwischen Endothelzell-spezifisch bindenden Aptameren und Aptameren, die auch andere Zelltypen markieren; (ii) zur Identifizierung von Aptameren, die ausschließlich an aktiviertes Endothel im Inneren des Tumors, nicht aber an ruhendes Endothel der Gefäße in peritumoralem Hirngewebe binden.



Schema 18. Herstellung von C6-Glioblastom-Gewebeschnitten des Rattenhirns und histologische Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer

Mittels intrakranieller, stereotaktischer Injektion einer C6-Glioblastoma-Zelllinie wurde im Hirn von Harlan Sprague Dawley-Ratten ein experimenteller Tumor induziert (5). Das Hirn wurde 23 Tage nach Implantation entnommen und daraus 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. In Anlehnung an histologische Färbung mit konventionellem Antikörper wurden die Gewebeschnitte mit Aptamerkonzentrationen zwischen 0.1 – 0.5 pmol/µl überschichtet und die Färbemuster nach Waschen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Erste Färbeversuche mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer III.1 vermochten zwar Mikrovaskulatur im Tumor zu visualisieren, die unspezifische Hintergrundfluoreszenz erschwerte jedoch eine sorgfältige Auswertung und Beurteilung der Aptamerselektivität. Durch Präinkubation der nativen Kryostatschnitte mit Hefe-tRNA (1 µg/µl in Selektionspuffer, 20 min, 4°C) vor der

eigentlichen Färbung mit FITC-18C-markiertem Aptamer III.1 (0.25 pmol/μl in Selektionspuffer, 40 min, RT, mit 1 μg/μl tRNA-Kompetitor) und anschließendem Waschen in einem Bad mit Selektionspuffer (0.2% BSA, 1 min) konnte die Hintergrundfluoreszenz beseitigt werden. Mit allen zu testenden Aptameren wurde schließlich nach diesem Muster gefärbt, fotografiert und ausgewertet.

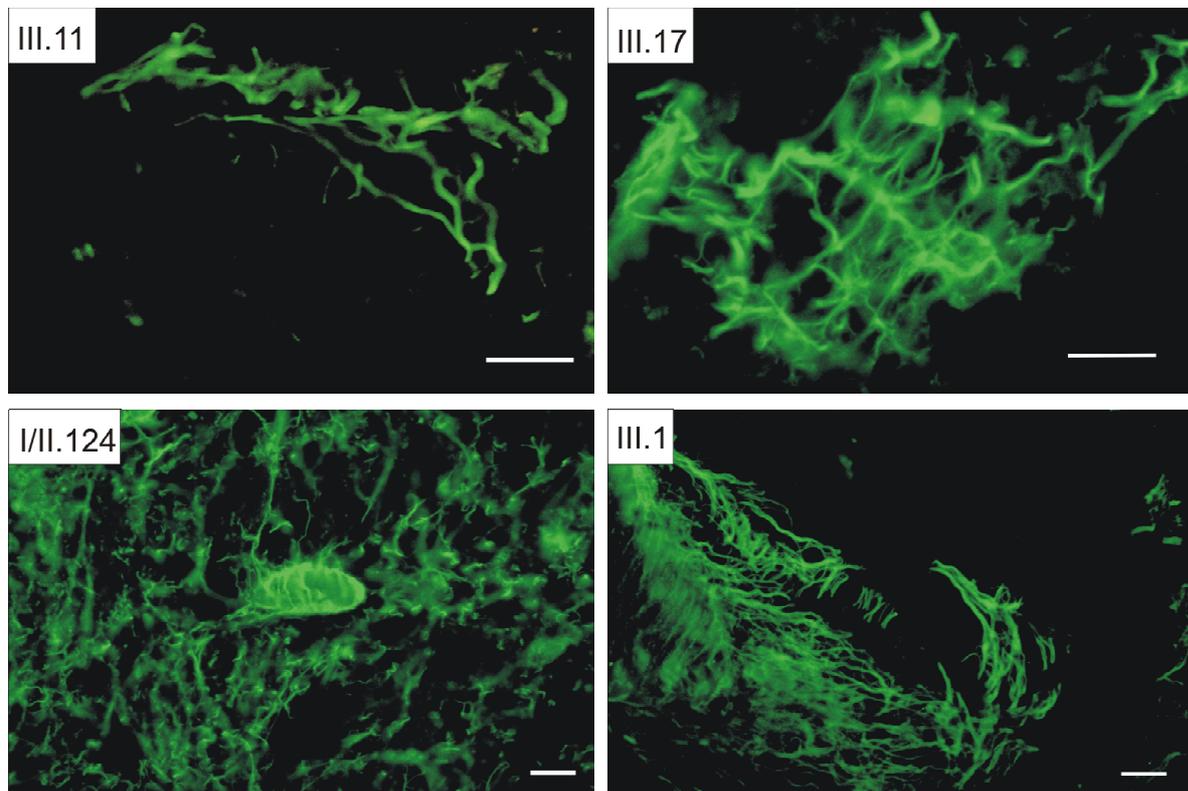
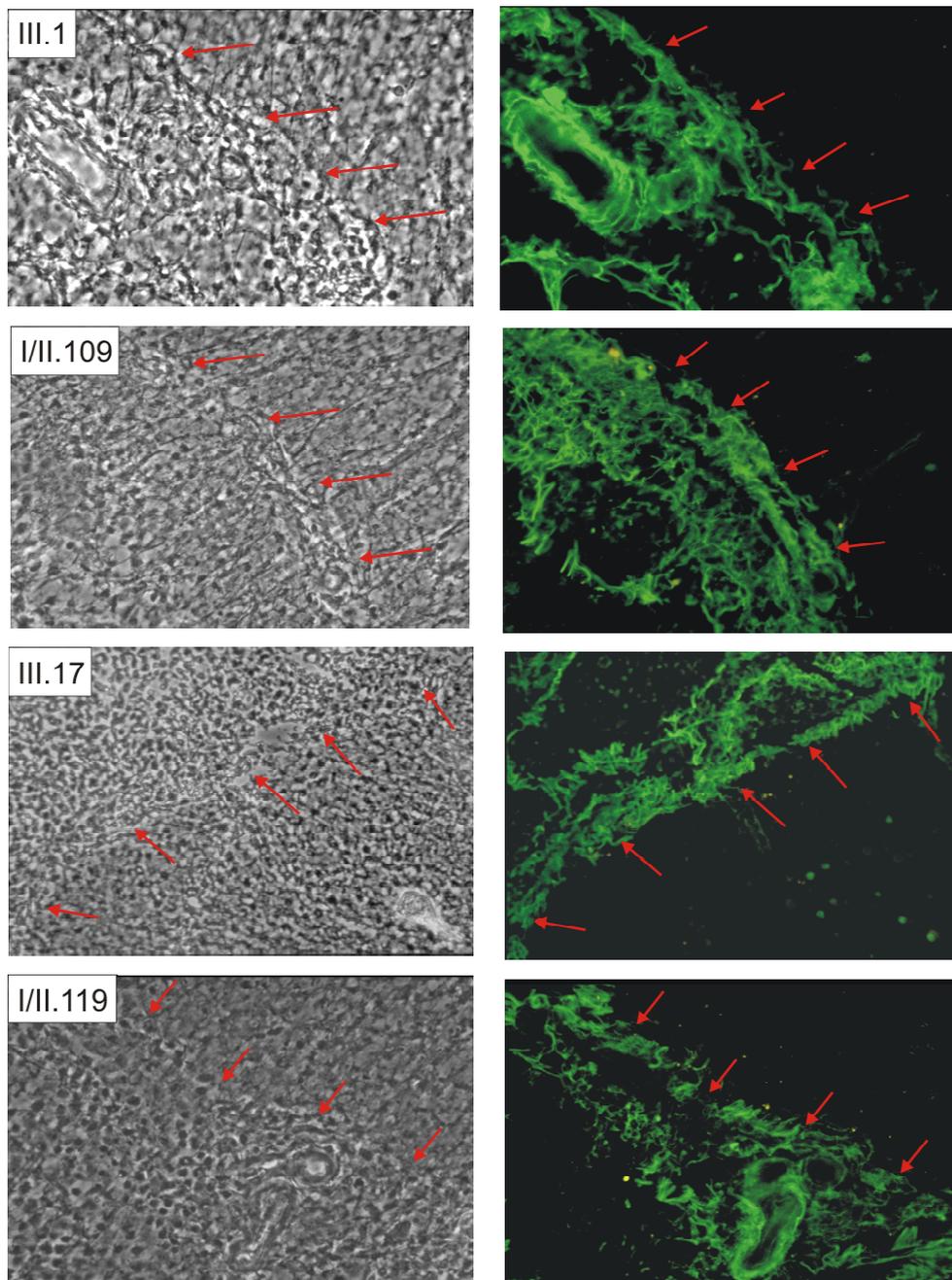


Abb. 5. Histologische Färbung der Tumormikrovaskulatur auf C6-Glioblastom-Gewebeschnitten des Rattenhirns mit den fluoreszenzmarkierten Aptameren III.11, III.17, I/II.124 und III.1 (Balken 50 μm)

Abb. 5 zeigt die Färbung von Glioblastom-Gewebeschnitten der vier – bereits in Kap. 6.5.1 vorgestellten – FITC-18C-markierten Aptamere III.11, III.17, I/II.124 und III.1. Sie sind die ersten Vertreter einer neuartigen Klasse von histologischen Reagenzien. Alle vier konnten Verlauf und Verzweigung der neugebildeten Tumormikrovaskulatur visualisieren (kein bislang bekannter Antikörper ist in der Lage, Mikrogefäße derart vollständig wiederzugeben). Die Aptamere III.1, III.17, I/II.124 und III.1 vermochten dabei, selektiv die neugebildete, aktivierte Mikrovaskulatur innerhalb der Tumoren zu färben. Keine anderen Zelltypen und keine endothelialen Strukturen in peritumoralem Gewebe wurden durch sie erkannt. Die analog durchgeführte Färbung mit unselektierter FITC-18C-markierter ssDNA der Startbibliothek (Negativkontrolle) vermochte auf den C6-Glioblastom-Gewebeschnitten keinerlei Strukturen zu visualisieren.

52 ssDNA-Sequenzen aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde wurden gemäß der beschriebenen Dekonvolution-SELEX-Schritte getestet. Die durchflusszytometrische Analyse identifizierte 49 FITC-18C-ssDNA-Sequenzen als Endothelzell-bindende Aptamere. Davon wiederum erkannten 21 Aptamere endotheliale Strukturen auf C6-Glioblastom-Gewebeschnitten nicht, aber auf Gewebeschnitten des Ratten-Normalhirns. Sechs Aptamere (III.1, I/II.109, III.17, I/II.119, I/II.124 und III.25) färbten das dichte Gefäßnetzwerk im Randbereich des eingekapselten Tumors besonders deutlich, Gefäße in peritumoralem Gewebe wurden dabei nicht erkannt (Abb. 6).



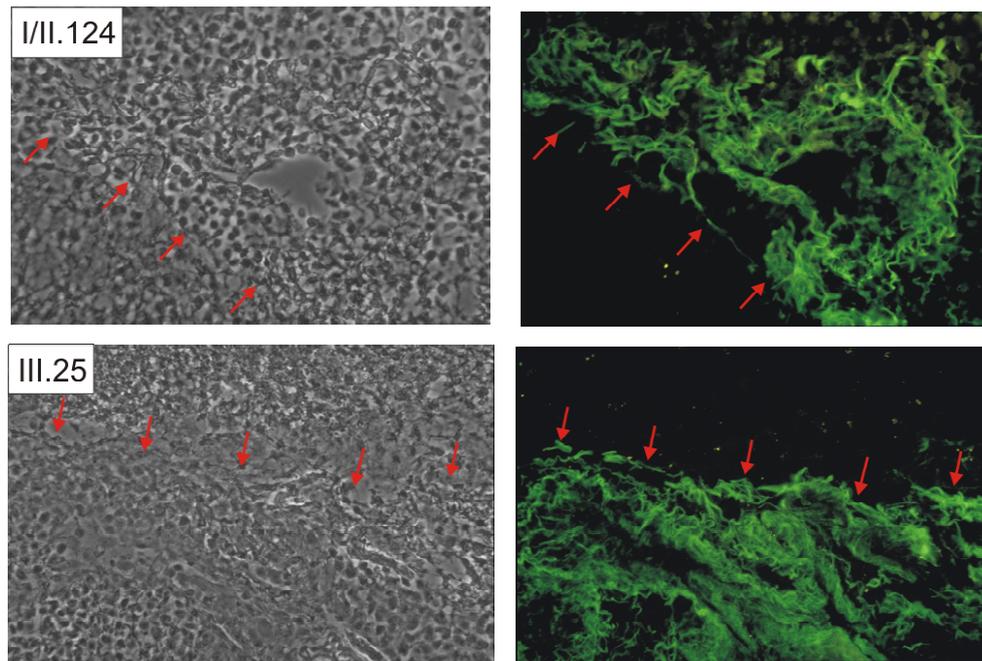
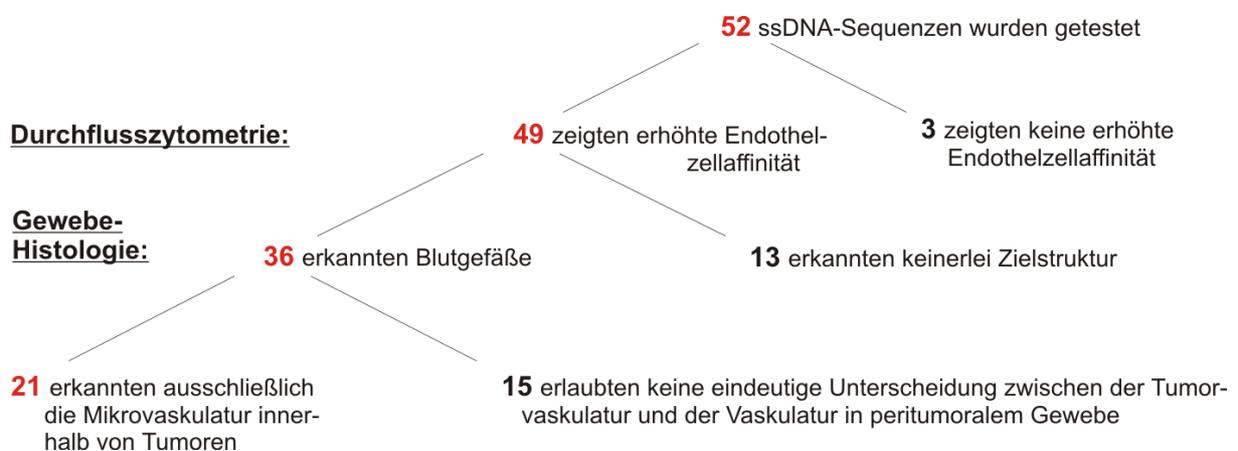


Abb. 6. Visualisierung des Tumorrandbereiches mit den FITC-18C-markierten Aptameren III.1, I/II.109, III.17, I/II.119, I/II.124 und III.25. In einer Zeile sind jeweils identische Bereiche des Gewebeschnittes abgebildet. Linke Spalte: Lichtmikroskopie. Rechte Spalte: Fluoreszenzmikroskopie. Die Pfeile zeigen aus der Richtung des peritumoralen Gewebes auf den im Vergleich zum „Normalhirn“ zellreichen Tumor.

Das Verhältnis (21 funktionelle Aptamere aus 52 getesteten Sequenzen) zeigte, dass Aptamere gegen aktivierte Endothelzellen in einem Ausmaß angereichert werden konnten, um mittels der beiden Dekonvolution-SELEX-Schritte mit vertretbarem Aufwand Kandidaten zu identifizieren, die in der Lage waren, selektiv Tumormikrogefäße zu erkennen (Schema 19). Die histologischen Färbemuster dieser 21 Aptamere gaben einen starken Hinweis auf die selektive Erkennung molekularer Adressen, durch die sich aktivierte Gefäße in Tumoren von ruhenden Gefäßen im gesunden Körper unterscheiden.



Schema 19. Anteil funktioneller Aptamere aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde nach Bindungsstudien gemäß der beiden Dekonvolution-SELEX-Schritte

6.5.2.2 Evaluierung der Aptamerselektivität gegen die aktivierte Mikrovaskulatur in entzündlichen Regionen des Rattenhirns

Die EAE geht mit einer Entzündungsreaktion des ZNS einher und wird häufig als Tiermodell zur Untersuchung der Autoimmunkrankheit MS herangezogen (114). EAE wurde durch die Injektion von Freuds Adjuvant und einer enzephalomyelogenen Peptidsequenz in Lewis Ratten induziert (100). Die Hirne wurde nach 14 Tagen zur Anfertigung von Kryostatschnitten (10 μm) entnommen. Die Identifizierung einzelner Aptamere mit der Fähigkeit, die Mikrovaskulatur in entzündlichen Regionen des EAE-Rattenhirns zu charakterisieren, erfolgte in Analogie zu den Färbungen der C6-Glioblastom-Gewebeschnitten: Die Hintergrundbindung wurde durch Präinkubation der Schnitte mit tRNA-Kompetitor in Selektionspuffer unterdrückt und anschließend, wie unter 6.5.2.1 beschrieben, mit FITC-18C-markiertem Aptamer gefärbt.

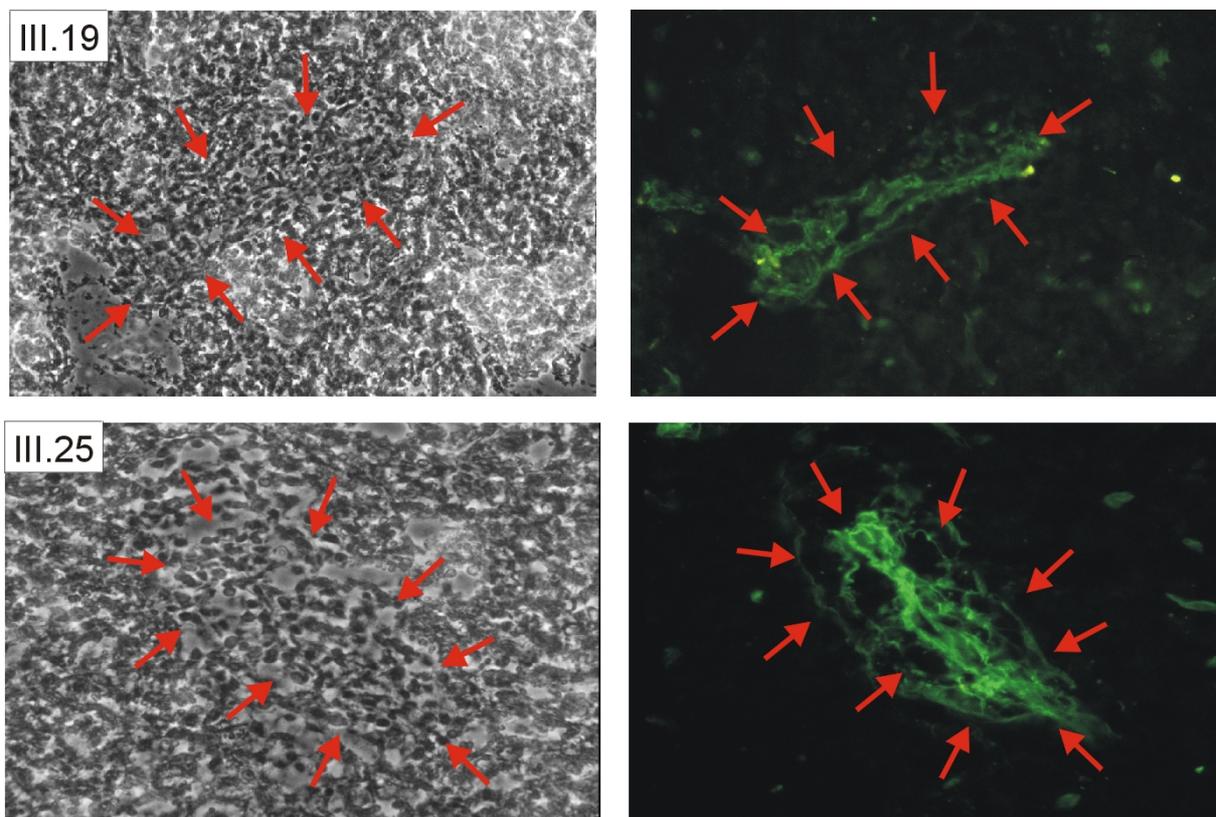


Abb. 7. Visualisierung von Gefäßen innerhalb von Gewebeeinfiltraten mit den FITC-18C-markierten Aptameren III.19 und III.25. In einer Zeile sind jeweils identische Bereiche des Gewebeschnittes abgebildet. Linke Spalte: Lichtmikroskopie. Rechte Spalte: Fluoreszenzmikroskopie. Die Pfeile zeigen auf Gefäße und sie umgebendes Infiltrat.

Aktiviertes Endothel in entzündlichen Regionen des EAE-Rattenhirns konnten auf einigen Gewebeschnitten durch eine erhöhte Zelldichte in unmittelbarer Nachbarschaft der

betroffenen Gefäße identifiziert werden. Diese Infiltrate – bestehend vor allem aus T-Lymphozyten – sind charakteristisch für entzündliche Regionen des ZNS, denn nur aktivierte Endothelzellen (aktiviert im Sinne erhöhter Permeabilität) erlauben die Passage von Blutzellen ins entzündete Gehirn (115). Aptamere mit der Fähigkeit, Blutgefäße selektiv innerhalb solcher Infiltrate anzufärben, erkennen konsequenterweise molekulare Adressen des aktivierten Endothels. Gefäße der EAE können jedoch auch in Abwesenheit von Infiltraten aktiviert sein. Infiltrate sind nur in einer bestimmten Phase der EAE nachzuweisen und konsequenterweise auch nur dann als Charakteristikum für den Entzündungsprozess heranzuziehen. In früheren oder späteren Stadien dieser Erkrankung sind die Endothelzellen zwar aktiviert, Infiltrate jedoch noch nicht vorhanden bzw. schon wieder verschwunden (116). Einzelne Aptamere, die pathologisches Endothel von gesundem unterscheiden können, wurden deswegen durch vergleichende Färbungen auf Gewebeschnitten des Ratten-Normalhirns identifiziert. Von den 52 getesteten Aptameren färbten zwölf ausschließlich die Vaskulatur auf EAE-Gewebeschnitten, nicht aber auf Gewebeschnitten des Normalhirns.

Tab. 2 zeigt eine Liste der 21 Aptamere, welche die aktivierten Gefäße des pathologischen Rattenhirns anzufärben vermochten, nicht aber die Vaskulatur von gesundem Hirngewebe. Die Basensequenzen dieser 21 Aptamere wurden ermittelt und ihre Sekundärstrukturen berechnet (siehe Experimenteller Teil, Kap. 3.1). Das „Alignment“ ihrer Sequenzen und der Vergleich der Sekundärstrukturen erlaubte jedoch kein Auffinden von gemeinsamen Bindungsmotiven. In SELEX-Experimenten gegen einzelne Zielproteine müssen zur Eingruppierung in unterschiedliche Aptamerfamilien (vgl. S. 14, Schema 7) in der Regel über 50 Aptamere miteinander verglichen werden (117, 109). Im Falle von komplexen Zielstrukturen stellen mehrere Aptamerfamilien gegen das gleiche Zielprotein eine Gruppe dar. Die simultane Selektion gegen mehrere Zielproteine liefert somit mehrere Gruppen von Aptamerfamilien. Zur Gruppierung in Aptamerfamilien zum Ermöglichen einer post-SELEX-Optimierung von Aptameren wäre die Sequenzanalyse einer unkalkulierbar großen Anzahl an Aptameren nötig. Da die 21 charakterisierten Aptamere die an sie gestellte Aufgabe ausgezeichnet erfüllten, konnte auf eine post-SELEX-Optimierung und somit auf die Sequenzierung weiterer Aptamere verzichtet werden (Basensequenzen, FACS-Analysen, Sekundärstrukturen sowie jeweils ein Färbebeispiel von C6-Glioblastom und EAE-Gewebeschnitten sind in Kap. 3.1 des Experimentellen Teils aufgeführt). Die Affinität, Selektivität und Lebensdauer dieser Aptamere waren ausreichend, um als neuartige histologische Marker auf Gewebeschnitten zur Charakterisierung des aktivierten Endothels herangezogen werden zu können.

Tab. 2. Histologische Studien auf Gewebeschnitten des pathologischen (C6, EAE) und des gesunden Rattenhirns mit fluoreszenzmarkierten Aptameren

Aptamer	C6-Glioblastom	EAE	Normalhirn
I/II.6	+	-	-
I/II.8	+	-	-
I/II.17	+	-	-
I/II.30	+	-	-
I/II.45	+	-	-
I/II.109	+	-	-
I/II.112	+	+	-
I/II.115	+	+	-
I/II.119	+	+	-
I/II.120	+	-	-
I/II.124	+	+	-
III.1	+	+	-
III.8	+	-	-
III.9	+	-	-
III.11	+	+	-
III.17	+	+	-
III.19	+	+	-
III.20	+	+	-
III.21	+	+	-
III.22	+	+	-
III.25	+	+	-

(+) endotheliale Zielstrukturen wurden erkannt; (-) keine Strukturen wurden erkannt

Aptamer III.1 zeigte – sowohl in den Bereichen des wachsenden Tumors als auch in entzündlichen Regionen des Rattenhirns – eine sehr intensive Färbung der Gefäße. Das Färbemuster ergab deutliche Hinweise, dass Aptamer III.1 eine molekulare Zielstruktur erkennt, deren Expression mit der Aktivierung von Endothelzellen einhergeht. Deswegen wurde Aptamer III.1 als Kandidat ausgewählt der, wie im Folgenden beschrieben, näher charakterisiert werden sollte.

7 Charakterisierung von Aptamer III.1

7.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Bindung von Aptamer III.1

7.1.1 Ermittlung der Endothelzellspezifität

Vergleichende Färbungen von subkonfluenten Endothel- und Mikrogliazellkulturen mit Aptamer III.1 (rote Kurve) und unselektierter ssDNA (schwarze Kurve) und anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigten die Anwesenheit der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 auf YPEN-1-Endothelzellen, nicht aber auf N9-Mikrogliazellen.

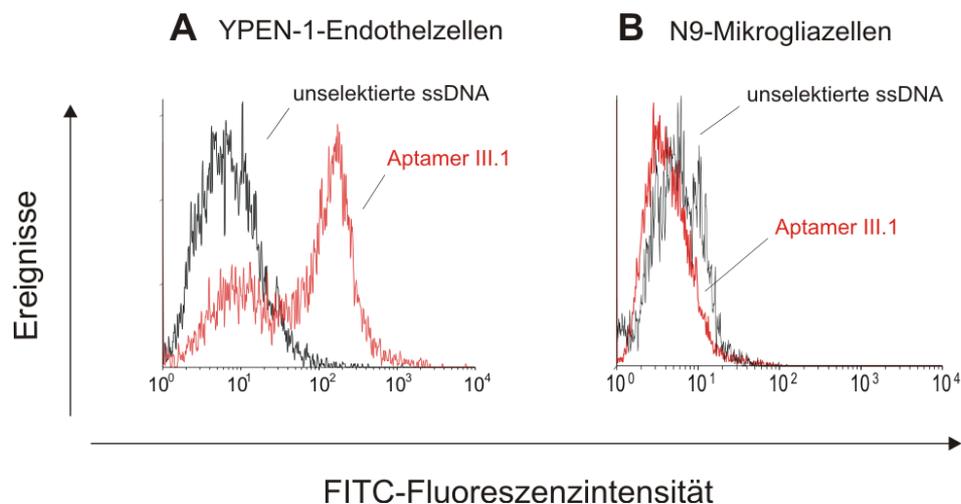


Abb. 8. Analyse der Endothelzell-Spezifität von Aptamer III.1 mittels Durchflusszytometrie durch vergleichende Färbung von **A**, YPEN-1-Endothelzellen und **B**, N9- Mikrogliazellen

7.1.2 Endothelzellstimulation mit H₂O₂

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie sie in Säugerzellen über unterschiedliche metabolische Übertragungswege produziert werden können, sind u.a. am Prozess der Wundheilung und an der Pathogenese von MS und EAE beteiligt (118-120). Es wird angenommen, dass diese Oxidantien von Makrophagen und Mikrogliazellen zur Abtötung von Bakterien und anderen aus dem Blutkreislauf infiltrierenden Substanzen produziert werden, die zu den EAE und MS begleitenden neurologischen Defiziten beitragen. Von ROS ist bekannt, dass sie Endothelzellen aktivieren und sie dazu veranlassen können, für ihre Aktivierung charakteristische Regulatorproteine zu produzieren. ROS induziert beispielsweise die Produktion von VEGF, ein das Wachstum und die Permeabilität von Endothelzellen beeinflussender Faktor (121, 122).

Zur Untersuchung, ob die von Aptamer III.1 erkannte Zielstruktur in ähnlicher Weise durch das oxidative Milieu – wie es in entzündlichen Läsionen der EAE vorherrscht – moduliert werden kann, wurde eine konfluente YPEN-1-Endothelzellkultur mit einer 1 mM H_2O_2 -Konzentration unter Zellkulturbedingungen stimuliert (37°C, 5% CO_2 , 15 min) (123, 124). Die stimulierten Endothelzellen wurden gewaschen und für weitere 4 h unter Standardzellkulturbedingungen rekultiviert. Die Modulierbarkeit der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 wurde durch Vergleich mit einer unstimulierten, konfluente YPEN-1-Endothelzellkultur am Durchflusszytometer untersucht.

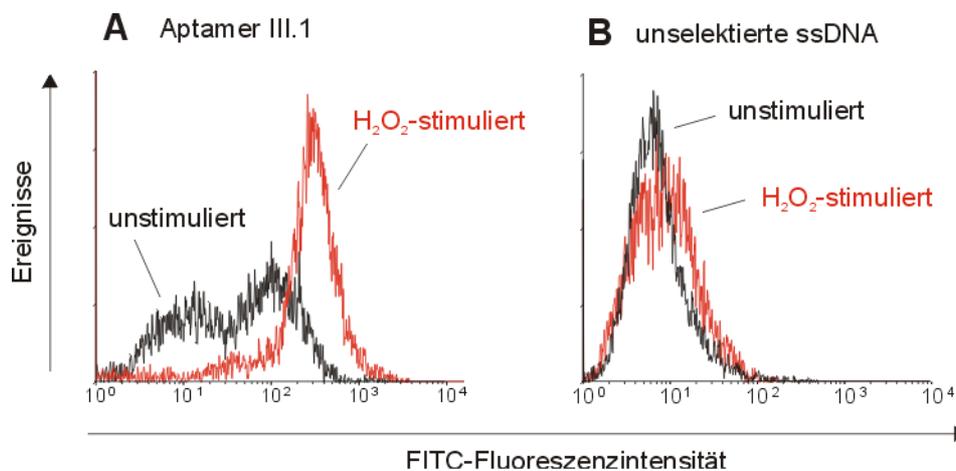


Abb. 9. Färbung von unstimulierten und H_2O_2 -stimulierten konfluente YPEN-1-Endothelzelllinien mit **A**, FITC-18C-Aptamer III.1 und **B**, unselektierter FITC-18C-ssDNA

Abb. 9 zeigt die Histogramme der Färbung von H_2O_2 -stimulierten Endothelzellen mit Aptamer III.1 (rote Kurven) im Vergleich zu unstimulierten Endothelzellen (schwarze Kurven). Die Verschiebung des Histogramms der mit Aptamer III.1 gefärbten, H_2O_2 -stimulierten Endothelzellen in Richtung größerer Fluoreszenzintensität (Abb. 9A, rote Kurve) zeigte eine Hochregulierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1. Die Färbung von Endothelzellen mit unselektierter ssDNA (Negativkontrolle) zeigte keine wesentliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der mit H_2O_2 -stimulierten Endothelzellen (Abb. 9B, rote Kurve) im Vergleich zu unstimulierten Endothelzellen (B, schwarze Kurve). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität der mit Aptamer III.1 gefärbten Zellen beruhte somit nicht auf H_2O_2 -vermittelte Verstärkung der unspezifischen Anlagerung von Nukleinsäuren.

7.2 Gewebe- und Zellkulturrehistologie

7.2.1 Histologische Doppelfärbung mit Aptamer III.1

Die Aptamer III.1 vermittelte Anfärbung von Mikrogefäßen selektiv im Tumor konnte durch Gegenfärbung der Zellkerne mit dem chromosomalen Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) gezeigt werden (125). Solide Tumoren zeichnen sich im Vergleich zu Normalgewebe durch eine erhöhte Zelldichte aus. Abb. 10A zeigt die Aptamer III.1 vermittelte Erkennung von Mikrogefäßen exklusiv in Bereichen der erhöhten Zelldichte des Tumors. In Bereichen geringere Zelldichte des peritumoralen Gewebes vermochte Aptamer III.1 hingegen keine Strukturen zu erkennen. Die Gegenfärbung mit dem blau fluoreszierenden DAPI erfolgte im Anschluss an die Färbung mit Aptamer III.1. Hierzu wurde der bereits mit Aptamer III.1 gefärbte Gewebeschnitt mit DAPI (300 nM in Selektionspuffer) für 3 min inkubiert.

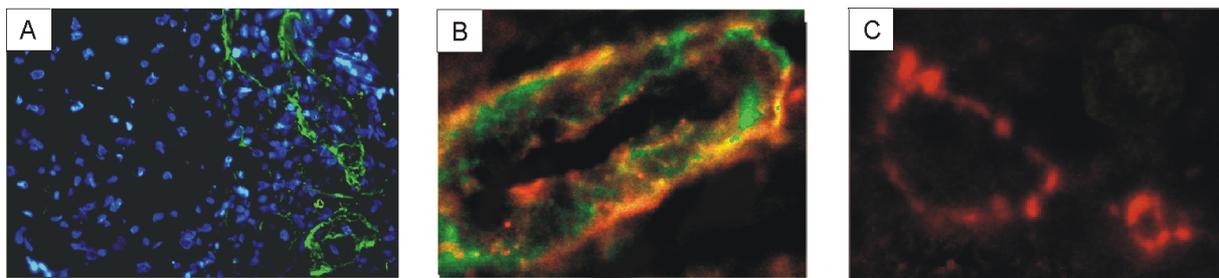


Abb. 10. Doppelfärbungen von C6-Glioblastom-Gewebeschnitten mit **A**, Aptamer III.1 (FITC-18C, grün) und dem chromosomalen Farbstoff DAPI (blau) und **B**, mit Aptamer III.1 (FITC-18C, grün) und dem mAb CD-31 (Cy-3TM, rot). Als Negativkontrolle wurde **C**, mit unselektierter FITC-18C-ssDNA und CD-31 (Cy-3TM, rot) doppelgefärbt.

Die Bestätigung, dass die von Aptamer III.1 erkannte molekulare Zielstruktur tatsächlich auf Endothelzellen lokalisiert ist, erfolgte durch Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper CD-31 (einem Endothelmarker) (126, 127) und Aptamer III.1. Die Färbung mit CD-31 (Farbstoff CyTM3, rot) erfolgte im Anschluss an die Färbung mit Aptamer III.1 (grün). Abb. 10.B zeigt die Doppelmarkierung von Endothelzellen mit Aptamer III.1 und dem mAb CD-31. Die Doppelfärbung mit CD-31 identifiziert somit die von Aptamer III.1 markierten Zellen als Endothelzellen. Als Negativkontrolle (Abb. 10C) wurden C6-Glioblastom-Gewebeschnitte mit unselektierter FITC-18C-ssDNA und CD-31 gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte keine Doppelmarkierung. Unselektierte ssDNA war nicht in der Lage, Strukturen auf Gewebeschnitten zu färben.

Die Aptamer III.1 vermittelte Färbung von Gefäßen im Bereich entzündlicher Regionen des EAE-Rattenhirns konnte durch Gegenfärbung zellulärer Gewebeeinfiltrate mit DAPI gezeigt werden. Abb. 11 visualisiert die Adhäsion (A) bzw. Transmigration (B) von infiltrierenden Zellen (blau) aus dem Blutkreislauf über die entzündete und daher durchlässige Endothelzellschicht der BHS.

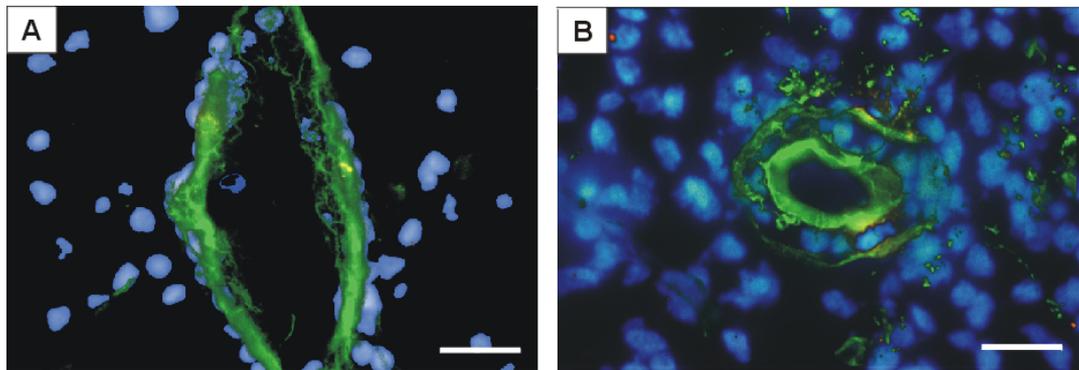


Abb. 11. Doppelfärbung von EAE-Gewebeschnitten mit FITC-18C-Aptamer III.1 (grün) und DAPI (blau) (Balken 50 μm).

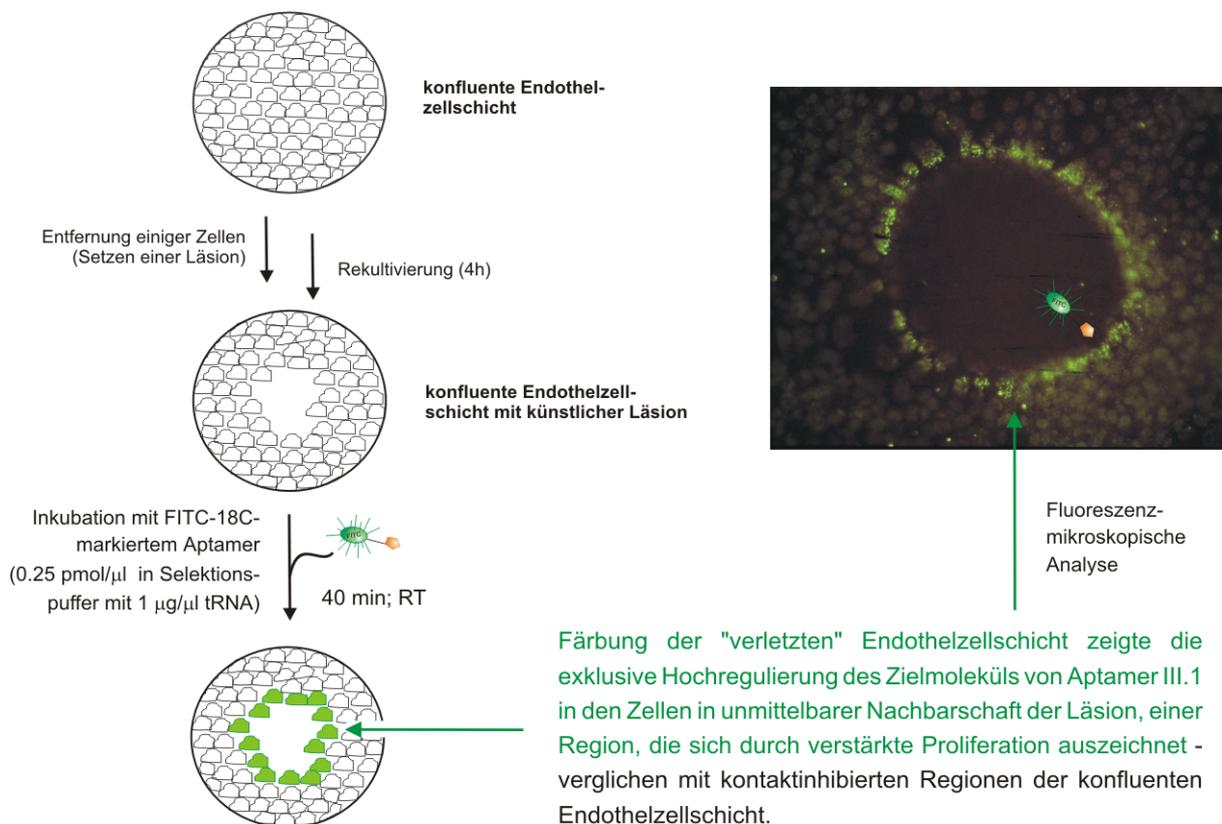
Durchgeführte histologische Studien zeigten, dass ssDNA-Liganden, die aus fluoreszenzmarkierten Bibliotheken gegen ganze Zellen selektiert wurden, in der Lage sind, als ein neuartiges histologisches Reagenz zu fungieren. Die Färbungen – insbesondere mit Aptamer III.1 – waren selektiv und intensiv. Unspezifischer Hintergrund konnte mit tRNA-Kompetitoren unterdrückt werden. Gegenfärbungen bzw. Doppelmarkierungen sind sowohl mit chromosomalem Farbstoff (DAPI) als auch mit herkömmlichen Antikörpern (CD-31) möglich. Zur Färbung konnten nur native Kryostat-Gewebeschnitten herangezogen werden. Zielstrukturen auf Parafin-Gewebeschnitten wurden von den Aptameren nicht erkannt.

7.2.2 Verwunden einer konfluenten Endothelzellschicht

In einer Monozellschicht wachsende Endothelzellen teilen sich bis zum Erreichen einer gewissen Dichte mit einer erhöhten Rate. Ist der Boden der Zellkulturflasche jedoch dicht bewachsen (die Endothelzellschicht konfluent), inhibieren sich die benachbarten Zellen durch so genannte Kontaktinhibierung gegenseitig in ihrer Proliferation. Es kann angenommen werden, dass korrelierend mit der Erniedrigung der Zellteilungsrate auch die Expression der dafür benötigten Proteine erniedrigt wird (128).

Um ein weiteres Indiz für die Beteiligung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 an der Endothelzell-Proliferation zu erhalten, wurde in eine konfluente Zellschicht von YPEN-1-

Endothelzellen – durch vorsichtige Entfernung einiger Zellen mit einer Pipette – eine Läsion gesetzt (129, 130). Die „verwundete“ Endothelzellkultur wurde für weitere 4 h rekultiviert und anschließend unter Zellkulturbedingungen mit FITC-18C markiertem Aptamer III.1 inkubiert (0.25 pmol/μl, 30 min, 37°C, mit 1 μg/μl tRNA-Kompetitor). Nach gründlichem Waschen wurde fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet: Aptamer III.1 färbte ausschließlich Endothelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft der künstlichen Läsion (Schema 20). Diese Zellen werden aufgrund unvollständigem Kontakt zu den Nachbarzellen nicht mehr an der Proliferation gehindert und proliferations-assoziierte Proteine können wieder verstärkt produziert werden.



Schema 20. Färbung einer „verwundeten“, konfluenten Endothelzellschicht mit Aptamer III.1 (FITC-18C, grün)

Der Glioblastom-Hirntumor ist aufgrund seiner hohen Proliferationsrate und Malignität für den Patienten meist tödlich. Die oft viele Zentimeter über den sichtbaren Infiltrationsraum hinausreichende Lokalisation vitaler Glioblastom-Tumorzellen ist durch bildgebende Verfahren nicht nachweisbar (131). Die vollständige operative Resektion des Tumors ist deswegen nur in den seltensten Fällen möglich. Patienten mit einer makroskopisch kompletteren Tumorsektion haben eine weitaus günstigere Prognose als Patienten, deren Tumor nur inkomplett entfernt werden konnte. Auf Tumor-Gewebeschnitten hat Aptamer

III.1 hohe Sensitivität und die Fähigkeit, Tumorgewebe von gesundem Gewebe abzugrenzen, bewiesen. Es wurde unter Bedingungen selektiert, die (i) ermöglichen, sein Zielprotein komplexiert seiner natürlichen Umgebung auf Endothelzellen zu erkennen und die (ii) seine Resistenz gegenüber Nukleasen beinhalten. Für die Zukunft geplante *in vivo*-Tests zur Diagnose von Glioblastom-Hirntumoren sind daher vielversprechend. Falls Aptamer III.1 unter *in vivo*-Bedingungen Tumorgewebe vom Gewebe des Normalhirns ähnlich deutlich unterscheidbar macht, könnte es – markiert mit einem geeigneten Reportermolekül – zur Lokalisation und Abgrenzung des Tumors herangezogen werden und dadurch eine komplettere Entfernung des Tumors ermöglichen. Dies hätte einen erheblichen Einfluss auf Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit des Patienten.

Eine molekulare Adresse, die neugebildete Gefäße im Tumor von prä-existierenden Gefäßen im gesunden Körper unterscheidbar macht, hat das Potenzial nicht nur zur Diagnostik solider Tumoren. Anstelle mit einem Fluoreszenzreportermolekül könnte Aptamer III.1 auch mit Therapeutika konjugiert werden. Es könnte als Trägermolekül mit der Fähigkeit, Zielstrukturen auf Gefäßen im Inneren von Tumoren zu erkennen, z.B. Cytostatika direkt in den Tumor transportieren. Die Identifizierung des Zielproteins von Aptamer III.1 war somit von großem Interesse.

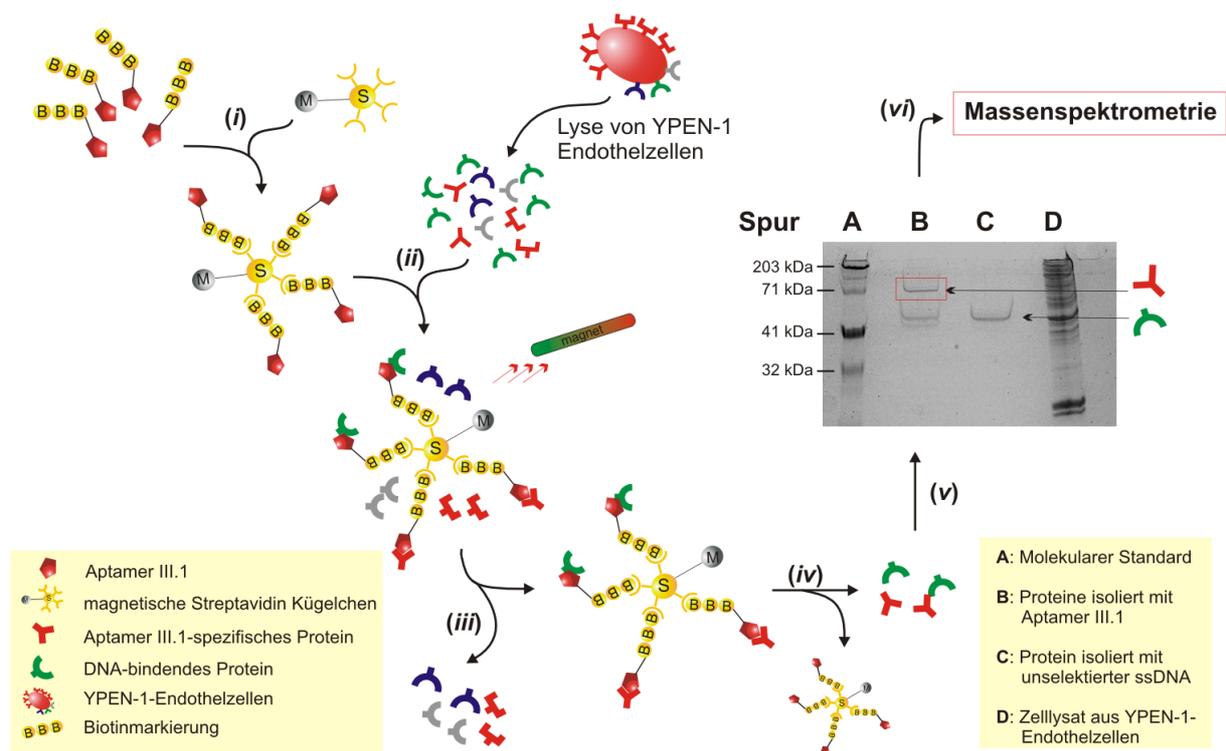
Das folgende Kapitel beschreibt die Ausarbeitung einer Methode zur Aptamer III.1-vermittelten Isolierung seines Zielproteins aus dem Zelllysate von YPEN-1-Endothelzellen.

7.3 Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1

Zur Charakterisierung des molekularen Zielproteins von Aptamer III.1 wurden säulenchromatographische Techniken zur Proteinreinigung durch die schneller durchführbare magnetische Festphasentechnologie ersetzt, ein Separationsprinzip, wie es bereits zur DNA-Festphasensequenzierung (132), zur mRNA-Reinigung (133) und in Zellseparationstechniken eingesetzt wird (134). Das magnetische Festphasenprinzip erlaubt Protein-ssDNA-Wechselwirkung mit Kinetiken, die denen in Lösung sehr nahe kommen. Besonders im Hinblick auf die enzymatische Labilität sowohl von ssDNA, aber auch von Proteinen in Zelllysaten (in Anwesenheit endogener DNasen und Proteinasen) ist die Anwendung einer schnell durchführbaren Technik Voraussetzung (135). Aptamer III.1 wurde durch eine Technik selektiert, welche seine Fähigkeit, das Zielprotein zu binden, von der Art der 5'-Modifikation weitgehend unabhängig machen sollte (vgl. Kap. 6.2.2). Der Ersatz der FITC-18C-Reportereinheit am 5'-Ende durch einen Tripple-Biotin-Rest und dessen Konjugation an

Streptavidin-beschichtete magnetische Kügelchen sollte deswegen die Struktur und somit die Funktionalität von Aptamer III.1 nicht beeinflussen.

Schema 21 zeigt die Vorgehensweise zur Isolierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1: (i) Dynabeads M-280 Streptavidin wurden durch Inkubation mit dreifach biotinyliertem (trB) Aptamer III.1 beschichtet und im Anschluss (ii) mit dem Zelllysat aus subkonfluenten YPEN-1-Endothelzellkulturen inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte im Hinblick auf den Erhalt möglichst nativer Proteinstrukturen unter milden Bedingungen (136). Zur Unterdrückung der DNase- und Protease-Aktivität wurde auf Eis für eine Dauer von lediglich 15 min in Selektionspuffer unter Zusatz von Proteinaseinhibitoren und einem Überschuss an tRNA-Kompetitor inkubiert. (iii) Nicht gebundene Proteine wurden nach Fixierung der Komplexe – bestehend aus magnetischen Dynabeads, Aptamer III.1 und daran gebundenem Protein – entfernt. Mehrere Waschschrte mit Selektionspuffer (mit erhöhter NaCl-Konzentration und unter Zusatz von tRNA-Kompetitor) ermöglichte dabei die Entfernung eines Großteils an unspezifisch gebundenem Protein.



Schema 21. Isolierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 aus YPEN-1-Zelllysat mittels magnetischer Festphasentechnologie

(iv) Die fest an Aptamer III.1 gebundenen Proteine wurden vom Dynabead-Aptamer-Komplex durch Inkubation in 1M NaCl-Lösung (30 min, 0°C) reisoliert, in SDS-Gelladepuffer (Sodium-Dodecyl-Sulfat) aufgekocht und (v) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Spur B). Als Negativkontrolle wurden die Schritte i – v unter identischen Bedingungen mit

unselektierter trB-ssDNA durchgeführt (Spur C). Vergleichende Analyse der Spuren B und C erlaubte schließlich die Identifizierung der Bande des spezifisch von Aptamer III.1 erkannten Proteins (roter Rahmen). (vi) Die Bande wurde ausgeschnitten und das enthaltene Protein – nach Verdau mit Trypsin – massenspektrometrisch charakterisiert. Alle verwendeten Puffer (Lyse-, Inkubations- und Waschpuffer) wurden auf 0°C vorgekühlt eingesetzt – die „Kühlkette“ während der gesamten Prozedur zu keinem Zeitpunkt unterbrochen.

Tab. 3 enthält eine Auflistung der Parameter, die zur Ausarbeitung der Proteinreinigungsprozedur variiert wurden (linke Spalte), und die letztendlich verwendeten Konditionen, die eine erfolgreiche Isolierung des spezifisch von Aptamer III.1 erkannten Proteins ermöglichten (rechte Spalte).

Tab. 3. Variierte Parameter zur Unterdrückung der unspezifischen Hintergrundbildung und letztendlich verwendete Konditionen zur Isolierung des Zielproteins von Aptamer III.1 aus YPEN-1-Zelllysate

Schritt [∇]	variierte Parameter	eingesetzte Konditionen
(ii)	Verhältnis von Aptamer III.1-beschichteten Dynabeads TM zur Menge an Zelllysate	1 mg Dynabeads TM , beschichtet mit 200 pmol trB-Aptamer III.1 / Zelllysate, hergestellt aus ca. 1.5 x 10 ⁸ YPEN-1-Endothelzellen;
(ii)	tRNA-Kompetitor-Konzentration im Inkubationspuffer	20 nM an tRNA (= 100-fach molarer Überschuss zu Aptamer III.1)
(iii)	tRNA-Kompetitor-Konzentration im Waschpuffer	2 nM an tRNA; (10-fach molarer Überschuss zu Aptamer III.1)
(iii)	Konzentration an NaCl im Waschpuffer	150 mM im ersten Waschschrift (1 ml), 100 mM im zweiten bis fünften Waschschrift (jeweils 200 µl); dem Waschpuffer wurde kein BSA zugegeben

[∇] siehe Schema 21

Abb. 12 zeigt das Comassie-Blau gefärbte Polyacrylamidgel zur Analyse der Proteinreinigung mit Aptamer III.1 (Spur B) im Vergleich zur analog durchgeführten Prozedur mit unselektierter ssDNA als Negativkontrolle (Spur C).

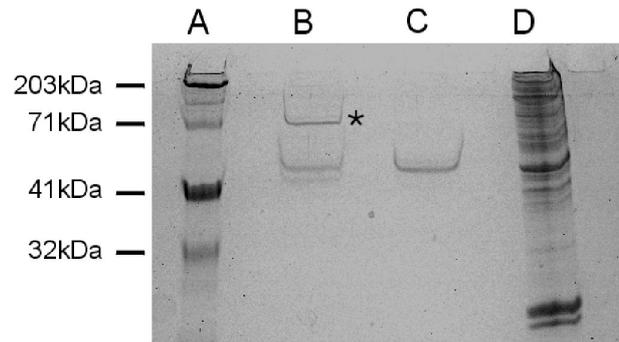


Abb. 12. Comassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel zur Analyse der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 (mit einem Stern markiert): Molekularer Marker (Spur A); Proteine isoliert mit Aptamer III.1 (Spur B); Protein isoliert mit unselektierter ssDNA (Spur C); unbehandeltes YPEN-1-Endothelzelllysate (Spur D)

Das Gel enthielt eine Bande auf der Höhe von ca. 70 kDa in der Spur von Aptamer III.1 (B), welche in der Spur der Kontrollreaktion (C) mit unselektierter ssDNA nicht vorhanden war. Diese wiederum enthielt eine einzelne Bande auf der Höhe von ca. 50 kDa, welche auch in der Spur von Aptamer III.1 zu sehen war. Das 50 kDa-Protein wurde massenspektrometrisch als „Heterogeneous Nuclear Riboprotein“ identifiziert: ein Protein, das in Säugerzellen stark exprimiert wird (sehr starke Bande im Gesamtzelllysate, vgl. Spur D). Wahrscheinlich erfolgte die ssDNA-vermittelte Isolierung des 50 kDa-Proteins (*i*) aufgrund seiner Dominanz in Säugerzellen und (*ii*) aufgrund seiner allgemeinen Affinität zu Nukleinsäuren (unabhängig von deren Sequenz). Diese Eigenschaften führten bereits in vorangegangenen Experimenten anderer Arbeitsgruppen (Proteinreinigung aus Säugerzellen) zur Detektion dieses Proteins (137).

Die ca. 70 kDa schwere Bande in der Spur von Aptamer III.1 wurde durch Tandem-Massenspektrometrie, gefolgt von der Sequenzierung dreier tryptischer Fragmente als Homolog der Ratte zum Pigpen-Protein der Maus identifiziert. Tab. 4 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz von Pigpen (Maus). Die sequenzierten Peptide sind rot markiert, die Schneidestellen von Trypsin – nach Lysin (K) und Arginin (R) – sind unterstrichen. Auffällig ist das Fehlen dieser Schneidestellen im N-terminalen Bereich des Proteins. Konsequenterweise konnten durch tryptischen Verdau des Gesamtproteins ausschließlich Peptide im C-terminalen Teil des Proteins identifiziert werden.

Tab. 4 Aminosäuresequenz des Proteins Pigpen (Maus)

gi|7920331|gb|AAF70602.1|[∇] **pigpen protein** [Mus musculus]:

MASNDYTQQATQSYGAYPTQPGQGYSSQSSQPYGQQSYSGYGQSADTSGYGQSSYGSSYGQT
 QNTGYGTQSAPQGYGSTGGYSSQSSQSSYQSSYPGYGQQPAPSSTSGSYGGSSQSSSYG
 QPQSGGYGQQSGYGGQQSYGQQSSYNPPQGYGQQNQYNSSSGGGGGGGGNYGQDQSSMS
 GGGGGGGYGNQDQSGGGGGYGGQQRGGRGRGGGGGYNRSSGGYEPRGRGGGRGGRGGMG
 GSDRGGFNKFGGPRDQGSRHDSEQDNSDNNTIFVQGLGENVTIESVADYFKQIGI IKTNKK**T**
GQPMINLYTDRETGK**LKGEATVSFDDPPSAKAAIDWFDGK**EFSGNPIKVSFATRRADFN**RG**
 GNRRGGRRGGPMGRGGYGGGSGGGRRGGFPSSGGGGGGQQRAGDWKCPNPTCENMNF**SWR**
 NECNQCKAPKPDGPGGGPGGSHMGGNYGDDRRRGGYDRGGYRGRGGDRGGFRGGRRGGDRG
 GFGPGKMDSRGEHRQDRRERPY

durch Sequenzierung identifizierte Peptide:

TGQPMINLYTDR

LKGEATVSFDDPPSAK

AAIDWFDGK

[∇] Accession Number

7.4 Das endotheliale Regulatorprotein Pigpen

Das 67-kDa schwere Pigpen ist ein relativ unbekanntes endothel- bzw. epithelzell-spezifisches Protein und ein Mitglied der EWS (Ewing Sarcoma) Proto-Onkogenfamilie. Bekannterweise korreliert die Expression von Pigpen mit dem Übergang vom ruhenden zum aktivierten endothelialen Phänotyp (138). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass das Pigpen-Protein in nicht proliferierenden Endothelzellen in kaum detektierbaren Mengen auftritt, seine Expression in sich aktiv teilenden Zellen jedoch verstärkt wird (139). In Endothelzellkulturen, in denen durch Zugabe der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF das Milieu in Tumoren simuliert wurde, konnte eine besonders drastische Expression des endothelialen Regulatorproteins detektiert werden (138, 140, 141).

Diese Befunde stehen im Einklang mit den im Zuge der hier vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen: (i) Färbungen von Gewebeschnitten des pathologischen Rattenhirns mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer III.1 ermöglichten die Detektion von Pigpen exklusiv in aktivierten Mikrogefäßen von Tumoren (Kap. 6.5.2.1) und entzündlichen Regionen der EAE (Kap. 6.5.2.2). (ii) Die Pigpenexpression konnte durch Simulation des oxidativen Milieus entzündlicher Regionen der EAE (Aktivierung von Endothelzellkulturen mit H₂O₂; Kap. 7.1.2) erhöht werden. (iii) Nach Setzen einer Läsion in eine kontakthinhibierte, konfluente

Endothelzellschicht konnte Pigpen ausschließlich in den Bereichen reaktiverter Zellproliferation detektiert werden (Kap. 7.2.2).

Diese Ergebnisse ergeben einen starken Hinweis, dass Pigpen als eine molekulare Adresse betrachtet werden kann, durch die sich das pathologische, aktivierte Endothel der BHS von ruhendem Endothel im gesunden Körper unterscheidet. Das bislang kaum beachtete Protein Pigpen hat somit großes Potenzial, als Zielstruktur zur Diagnose von Hirntumoren und entzündlicher Erkrankungen des Gehirns (EAE, MS) herangezogen zu werden. Möglicherweise kann Pigpen auch für therapeutische Strategien als Zielprotein fungieren: Aptamer III.1, konjugiert mit Cytostatika oder Radiopharmazeutika, könnte diese zielgerichtet an ihren Bestimmungsort im Tumor transportieren. Durch Zerstörung der tumoreigenen Blutgefäße könnte so die Nährstoffversorgung unterbunden und dadurch Tumorwachstum und Metastasierung verhindert werden.

8 Zusammenfassung

Glioblastom-Hirntumore und die entzündliche Erkrankung Multiple Sklerose (MS) sind schwerwiegende Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS), deren Progredienz auf eine Fehlfunktion der Blut-Hirnschranke (BHS) zurückzuführen ist (142, 143). Die BHS-bildenden Endothelzellen sind im gesunden Körper normalerweise ruhend. In soliden Tumoren jedoch teilen und organisieren sie sich, um ein neues, den Tumor mit Nährstoffen versorgendes Blutgefäßsystem zu bilden. Dieser als Tumorangiogenese bezeichnete Vorgang sorgt dafür, dass der Nährstoffbedarf des Tumors gewährleistet bleibt, Wachstum und Metastasierung von Tumoren werden dadurch überhaupt erst ermöglicht. Im Falle der MS ermöglicht eine erhöhte transzytotische Aktivität der Endothelzellschicht die Transmigration von T-Lymphozyten über die normalerweise für Zellen (und die meisten Makromoleküle des Blutes) weitgehend undurchlässige BHS. Im ZNS angekommen, induzieren diese Infiltrate weitere Entzündungsherde und tragen so zur Verschlechterung des Krankheitsbildes bei. Sowohl die aktivierten Endothelzellen der pathologischen BHS in Glioblastomen als auch die Endothelzellen in entzündlichen Hirnregionen der MS unterscheiden sich von denen der gesunden BHS durch quantitative und qualitative Unterschiede in der Expression bestimmter Proteine. Proteine, die somit als eine Art molekulare Adresse zur Diagnose der jeweiligen Erkrankung herangezogen werden können (19).

Kombinatorisch-chemische Methoden, eingesetzt gegen solche molekularen Adressen, ermöglichen die Produktion von Liganden, die – markiert mit einem Reportermolekül – das Potenzial bieten, selektiv an aktiviertes Endothel in Tumoren (144) und entzündlichen Regionen (145) des ZNS zu binden und dadurch pathologisches Gewebe diagnostizieren und von gesundem Hirngewebe unterscheiden können. Eine kombinatorisch-chemische Methode zur Produktion relativ kleiner Nukleinsäureliganden (Aptamere genannt, aptus = „passen“) nennt sich Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) (32). Sie bedient sich immens komplexer Molekülbibliotheken, bestehend aus bis zu 10^{15} einzelsträngigen DNA- (ssDNA) oder RNA-Polynukleotiden. Durch sequenzbedingte Ausbildung intramolekularer Basenpaare können diese zu sehr stabilen 3-dimensionalen Strukturen falten, welche „passende“ Proteine (aber auch andere Molekülklassen) wie ein Schlüssel das passende Schloss zu erkennen vermögen (32). Durch wiederholte Zyklen von Inkubation der Molekülbibliotheken mit der entsprechenden Zielstruktur, gefolgt von der Isolierung und Verstärkung der gebundenen Liganden ermöglicht dieser *in vitro*-Evolutionsprozess, die Anreicherung von Aptameren, die das Zielprotein selektiv und mit hoher Affinität binden können. Die 1990 von Gold (37) und Ellington (38) zeitgleich

entwickelte Technologie zur Produktion der relativ einfach aufgebauten und leicht zu modifizierenden Aptamerliganden hat großes Potenzial, die in diagnostischen Tests bis dato unbestrittene Sonderstellung der monoklonalen Antikörper (mAb) streitig zu machen. In den letzten elf Jahren haben zahlreiche Arbeitsgruppen und Firmen damit begonnen, auf mAb basierende diagnostische Tests auf die leichter handhabbaren Aptamere zu übertragen. In ELISA-Tests (68), in der Durchflusszytometrie (84, 85) und in Biosensoren (86-88) werden Aptamere beispielsweise bereits erfolgreich eingesetzt. Weitere vielversprechende diagnostische Plattformen (z.B. Aptamerarrays zur Proteomanalyse) befinden sich in der Entwicklung (89, 146, 66). Im Zuge dieser Arbeit sollte eine weitere, von mAb dominierte diagnostische Plattform auf Aptamere übertragen werden: Aptamere sollten erstmals als histologische Reagenzien auf Gewebeschnitten eingesetzt werden.

Die auszuarbeitete Strategie zur Produktion von Aptamerliganden sollte folgenden Anforderungen genügen:

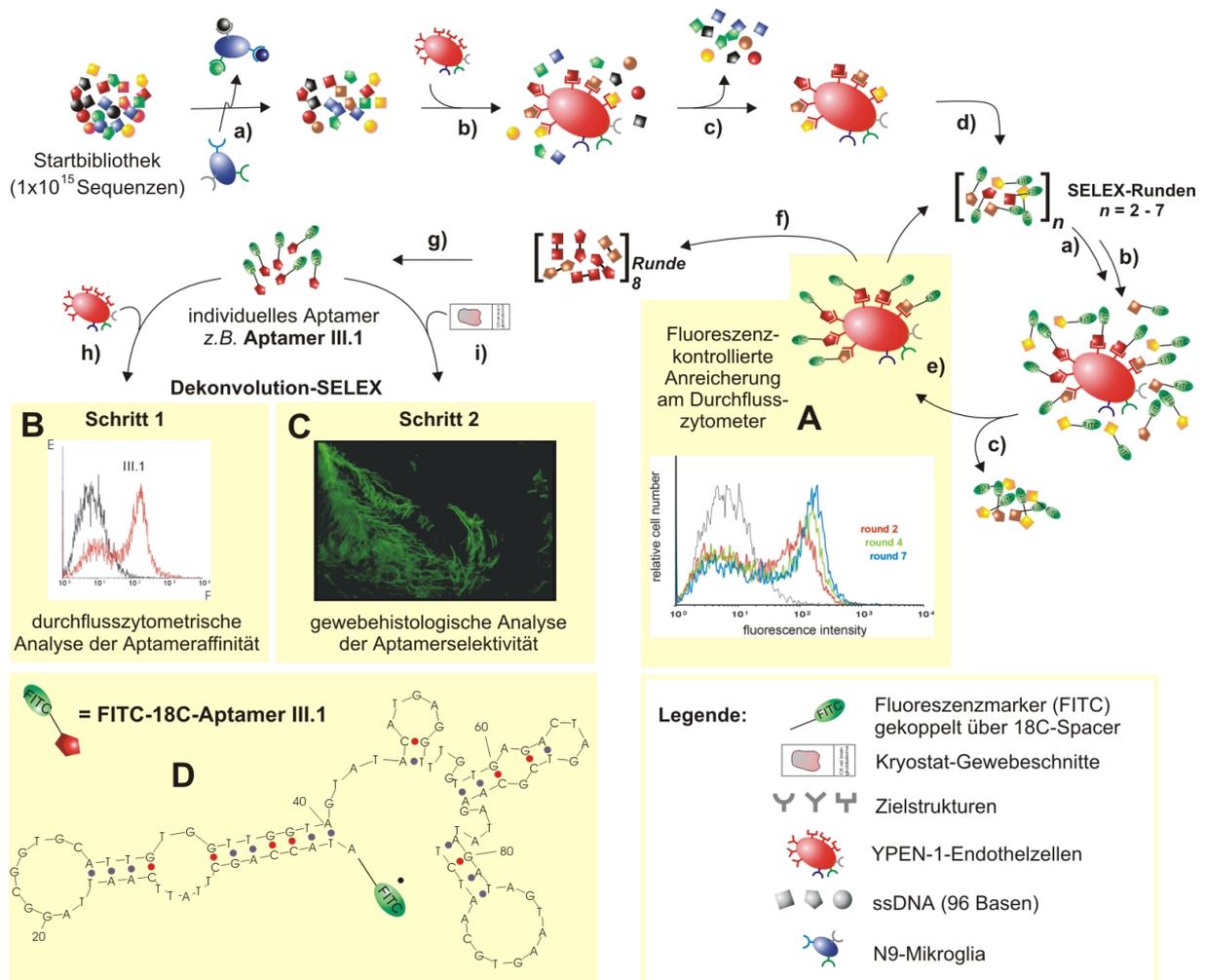
(i) Die selektierten Aptamere sollten erstmals als neuartige histologische Marker auf Gewebeschnitten eingesetzt werden können, die in der Lage sind, selektiv molekulare Adressen der aktivierten Mikrovaskulatur auf Gewebeschnitten experimenteller C6-Glioblastomae (als Rattenmodell für Glioblastom-Hirntumore) (5) und auf Gewebeschnitten der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE, als Rattenmodell für MS) (6) erkennen zu können. Mit einem Fluoreszenzreportermolekül versehen sollten sie die aktivierte BHS visualisieren und somit pathologisches Hirngewebe von gesundem unterscheidbar machen können.

(ii) Die aktivierte Endothelzelle konnte bislang noch nicht ausreichend untersucht werden. Die auszuarbeitende Methode sollte deswegen das Potenzial bieten, neue Erkenntnisse über die Endothelzell-Differenzierung in Tumoren und entzündlichen Regionen des ZNS zu liefern. Die Wahl der geeigneten Zielstruktur(en) sollte somit ermöglichen, Proteine aufzuspüren, deren Beteiligung und Funktion in der Tumorangiogenese und/oder bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS bislang noch unbekannt sind.

(iii) Sowohl die Überwachung der Anreicherung funktioneller Aptamere in den Bibliotheken der voranschreitenden Selektionsrunden als auch die Identifizierung einzelner funktioneller Aptamere aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde sollte mittels Fluoreszenzdetektion erfolgen – die bis dato übliche radioaktiv-kontrollierte Anreicherung vermieden werden.

8.1 Der SELEX-Prozess

Die Anforderungen (*i – iii*) berücksichtigend, wurde die in Schema 22 skizzierte Selektionsstrategie ausgearbeitet und angewendet. Um die Konformation potenzieller Zielproteine, ähnlich der auf Gewebeschnitten, in möglichst natürlichem Zustand zu belassen, wurde unter physiologischen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C und unter Verwendung eines Selektionspuffers mit physiologischen Salzkonzentrationen (50 mM Tris·HCl (pH 7.4), 5 mM KCl, 10 mM NaCl, 1mM MgCl₂) selektiert.



Schema 22. Selektionsstrategie zur Produktion von Aptamerliganden mit der Fähigkeit zur Charakterisierung von pathologischem Endothel der BHS

Zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundbindung von ssDNA wurde dem Reaktionsgemisch ein jeweils 5-fach molarer Überschuss an Hefe-tRNA- und BSA-Kompetitoren zugesetzt. Als Zielstrukturen kamen dabei ganze Zellen zum Einsatz (siehe Schema 22): **a)** Aptamere, die an Endothel-irrelevante Zielstrukturen binden, wurden durch Gegenselektion sowohl der Startbibliothek als auch der folgenden Bibliotheken mit N9-Mikrogliazellen reduziert (111). **b)** Die gegenselektierte Bibliothek wurde mit YPEN-1-

Endothelzellen inkubiert, c) ungebundene ssDNA wurden aus dem Selektionsprozess entfernt. d) Endothelzell-gebundene Aptamere wurden mittels PCR vervielfältigt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. e) Die Endothelzellbindung fluoreszenzmarkierter Aptamere wurde in Selektionsrunde 2 – 7 am Durchflusszytometer analysiert. f) Aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde wurden einzelne Aptamere isoliert und g) mit FITC-18C markiert. Ihre Funktionalität wurde mittels zweier Dekonvolution-SELEX-Schritte analysiert: h) Die Analyse ihrer Endothelzell-Affinität erfolgte am Durchflusszytometer. i) Die Analyse ihrer Endothelzell-Selektivität erfolgte durch histologische Untersuchungen auf Gewebeschnitten.

Als Zielstruktur wurden SV40-transformierte, aktiv proliferierende YPEN-1-Endothelzellen aus Kulturen mit ihrer Fülle an potenziellen molekularen Zielstrukturen als so genannte komplexe Zielstruktur eingesetzt. Im Wesentlichen aus folgenden Gründen:

- Es kann angenommen werden, dass Zellen einer aktivierten Endothelzellkultur ein Profil molekularer Adressen bieten, welches dem von Endothelzellen der aktivierten Mikrovaskulatur sehr ähnlich ist (101).
- Ganze Zellen präsentieren die molekularen Zielstrukturen eingebettet in ihre natürlichen Umgebung. Somit konnten überwiegend Aptamere gegen Epitope der Zielstrukturen selektiert werden, die auch auf Gewebeschnitten frei zugänglich sind.
- Der Einsatz von zellulären Zielstrukturen im Laufe des *in vitro*-Evolutionsprozesses bevorzugte diejenigen Aptamere, die aufgrund ihrer Struktur gegenüber enzymatischem Verdau durch endogene Nukleasen weitgehend resistent waren. Diagnostische Tests mit biologischem Material (Durchflusszytometrie, Gewebehistologie) ließen sich mit 49 der 52 getesteten Aptamere durchführen (übermäßige Nukleaseaktivität wurde durch Zusatz von 0.1% NaN₃, sowohl während der Selektion als auch bei funktionellen Tests mit biologischem Material reduziert).

Die Markierung der ssDNA-Bibliotheken erfolgte mit einem Fluoreszein-Thioisocyanat-Reportermolekül (über einen 18-Kohlenstoff-Platzhalter am 5'-Ende platziert; FITC-18C) schon im Laufe des Selektionsprozesses. Aus folgenden Gründen:

- Durch FITC-18C-Markierung der ssDNA-Bibliotheken konnte die radioaktive Anreicherungskontrolle durch eine am Durchflusszytometer analysierte Fluoreszenzkontrolle ersetzt werden (Schema 22A).
- Die nachträgliche Markierung (post-SELEX) von Aptameren mit einem Reportermolekül könnte die Struktur und somit die Bindungsfähigkeit von Aptameren zerstören (113).

Einzelne, gegen molekulare Adressen der aktivierten Mikrovaskulatur gerichtete FITC-18C-markierte Aptamere konnten aus der Bibliothek der achten Runde effektiv mittels zweier Dekonvolution-SELEX-Schritte identifiziert werden:

- Durch Analyse ihrer relativen Endothelzellaffinität (im Vergleich zu unselektierter FITC-18C-markierter ssDNA) am Durchflusszytometer (Schema 22B).
- Analyse ihrer Selektivität bzgl. der aktivierten Mikrovaskulatur durch vergleichende histologische Färbestudien auf Gewebeschnitten des C6-Glioblastoms bzw. des EAE-Rattenhirns und Gewebeschnitten des Ratten-Normalhirns (Schema 22C).

Von insgesamt 52 getesteten FITC-18C-markierten Aptameren aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde vermochten schließlich 21, selektiv die aktivierte Mikrovaskulatur auf C6-Glioblastom-Gewebeschnitten zu färben. Die Vaskulatur in gesundem Gewebe wurde von ihnen nicht erkannt. Zwölf FITC-18C-markierte Aptamere erkannten selektiv die aktivierte Mikrovaskulatur in entzündlichen Regionen auf EAE-Gewebeschnitten. Gefäße im gesunden Gehirn wurden von ihnen nicht gefärbt.

8.2 Charakterisierung von Aptamer III.1

Die 21 funktionellen Aptamere wurden sequenziert, ihre Basensequenz zur Ermittlung homologer Bindungsmotive miteinander verglichen und ihre Sekundärstrukturen berechnet. Ein Strukturvorschlag für Aptamer III.1 (berechnet und „gefaltet“ durch das Computerprogramm „mfold“) zeigt exemplarisch Abb. 22D. Aufgrund intensiver und selektiver histologischer Färbemuster (Schema 22C) wurde Aptamer III.1 als Kandidat ausgewählt, der näher charakterisiert werden sollte.

8.2.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellbindung von Aptamer III.1

- Die Endothelzell-Spezifität von Aptamer III.1 konnte durch vergleichende Färbung von YPEN-1-Endothelzellen (Abb. 13A, rote Kurve) und N9-Mikrogliazellen (Abb. 13B, rote Kurve) bestätigt werden. Im Vergleich zu unselektierter FITC-18C-markierter ssDNA (Abb. 13A, B, schwarze Kurven) zeigte Aptamer III.1 eine erhöhte Affinität gegenüber Endothelzellen, nicht aber gegenüber Mikrogliazellen.
- Die Simulation des in entzündlichen Regionen der MS bzw. EAE vorherrschenden oxidativen Milieus durch Stimulation von konfluenten Endothelzellkulturen mit H₂O₂ (Abb. 13C, rote Kurve) zeigte im Vergleich mit unstimulierten, konfluenten

Endothelzellkulturen (Abb. 13C, schwarze Kurve) eine Hochregulierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1.

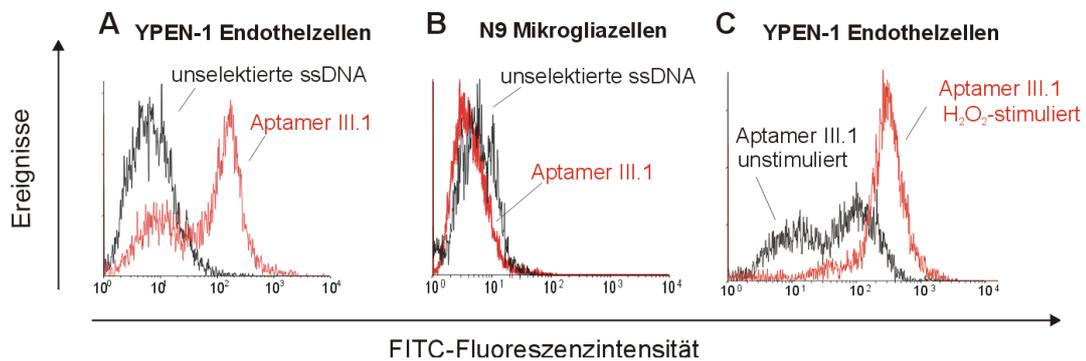


Abb. 13. Durchflusszytometrische Analyse der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1

8.2.2 Histologische Charakterisierung der Gewebbindung von Aptamer III.1

- Doppelfärbungen von Endothelzellen auf C6-Glioblastom-Gewebeschnitten mit dem monoklonalen Antikörper CD-31 (gekoppelt an CyTM3, rot) (126) und FITC-18C-markiertem Aptamer III.1 (grün) belegten die Endothelzell-Spezifität der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 (Abb. 14A).
- Gegenfärbung der Zellkerne mit dem chromosomalen Fluoreszenzfarbstoff 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (125) auf C6- und EAE-Gewebeschnitten zeigten die Anwesenheit des Zielproteins von Aptamer III.1 selektiv auf aktiviertem Endothel der Mikrogefäße in den Regionen des zellreichen Tumors (Abb. 14B) bzw. in den zellreichen Regionen des für die EAE charakteristischen Gewebeinfiltrats (Abb. 14C).
- Die Aptamer III.1-vermittelte Färbung von reaktivierten Endothelzellen in unmittelbarer Nachbarschaft einer mechanisch gesetzten Läsion im Zellrasen einer ansonsten konfluenten, sich durch Kontaktinhibition am Wachstum hindernden Endothelzellkultur (129) zeigte die Beteiligung des Zielproteins von Aptamer III.1 an der Zellproliferation (Abb. 14D).

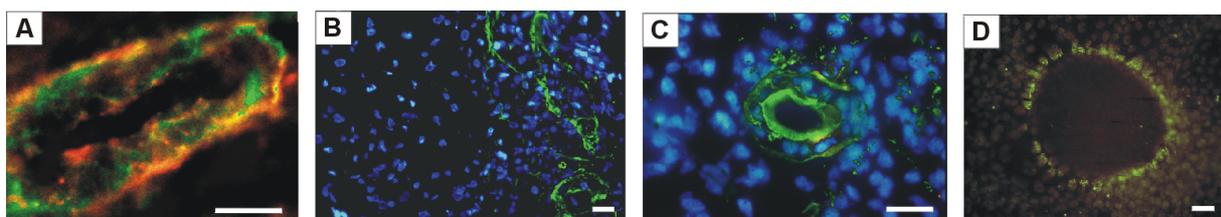


Abb. 14. Histologische Analyse der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 (Balken 50 μ m)

8.1.3 Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1

Die Beschichtung von magnetischen Kügelchen mit Aptamer III.1, gefolgt von ihrer Inkubation mit dem YPEN-1-Endothelzellysat ermöglichte die Isolierung seines Zielproteins nach dem magnetischen Festphasenprinzip. Gelelektrophoretische Analyse durch Vergleich der mit Aptamer III.1 isolierten Proteine (Spur B) mit Proteinen, isoliert mit unselektierter ssDNA (Spur C), und massenspektrometrische Charakterisierung von drei tryptischen Peptidfragmenten der für Aptamer III.1 charakteristischen Bande ermöglichte die Identifizierung seines Zielproteins als das 67 kDa schwere Pigpen-Protein. Ein bislang wenig beachtetes endotheliales Regulatorprotein, von dem bekannt ist, dass seine Expression mit der Aktivierung von Endothelzellen einhergeht (138).

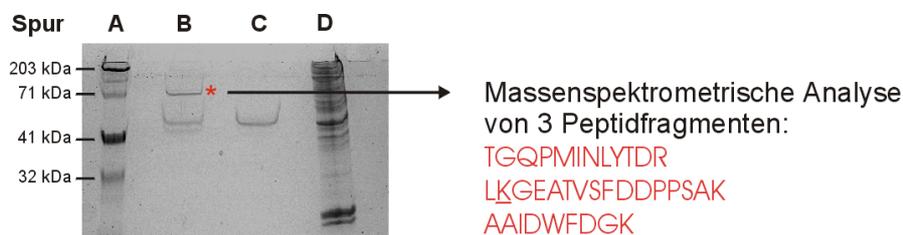


Abb. 15. Coomassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel zur Analyse der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1 (mit einem Stern markiert): Molekularer Marker (Spur A); Proteine, isoliert mit Aptamer III.1 (Spur B); Protein, isoliert mit unselektierter ssDNA (Spur C); unbehandeltes YPEN-1-Endothelzellysat (Spur D)

Die Selektionsprozedur zur Erzeugung von Aptameren mit der Fähigkeit, als histologische Marker aktiviertes Endothel in C-6-Tumoren und entzündlichen Regionen des EAE-Rattenhirns zu erkennen, erlaubte eine effektive Anreicherung innerhalb von nur acht Selektionsrunden. Die Identifizierung einzelner funktioneller Aptamere aus der Bibliothek der letzten Selektionsrunde erfolgte problemlos durch die Anwendung der beiden Dekonvolution-SELEX-Schritte. Die Methode erlaubte – unter Ersatz radioaktiver Reagenzien – eine auf Fluoreszenzdetektion basierende Analyse der Anreicherung. Der Einsatz von ganzen Endothelzellen als komplexe Zielstrukturen ermöglichte die Untersuchung der Endothelzelldifferenzierung der pathologischen BHS in Glioblastom-Hirntumoren und entzündlichen Bereichen des Rattenhirns. Insbesondere Aptamer III.1 zeigte eine derart selektive und intensive Färbung der pathologischen Vaskulatur, dass sein Zielprotein „Pigpen“ großes Potenzial hat, in klinischen Anwendungen als Zielstruktur zur sensitiven Lokalisation von Glioblastomen und entzündlichen Regionen der MS herangezogen zu werden. Eine sensitive Abgrenzung des Tumorrandes vom Normalhirn würde eine vollständigere Resektion des Tumors ermöglichen und somit die Überlebenszeit und rezidivfreie Zeit – die nachweislich von der Resttumorgröße abhängt – erheblich verlängern

(10). Da im Falle der MS pathologische Störungen der BHS-Funktion schon lange vor ersten neurologischen Symptomen auftreten, hat anti-Pigpen-Aptamer III.1 das Potenzial zur Früherkennung dieser progredient verlaufenden und in weiter fortgeschrittenen Stadien nicht mehr heilbaren Erkrankung. (12).

EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Methoden

1.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in RPMI-1640-Medium (Gibco, Karlsruhe) mit 10% Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS, Seromed, Berlin) und 1.2% Penicilin/Streptomycin kultiviert (Vollmedium; 37°C, 5% CO₂). Die Inaktivierung von FCS erfolgte durch Inkubation bei 58°C für 1 h. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Aliquots von ca. 1×10^7 Zellen in FCS unter Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff. Zum Splitten und Ernten der Zellen wurde für 5 min bei 4°C bei 1000 U/min zentrifugiert. Die für die jeweiligen Experimente benötigte Anzahl intakter Zellen wurden durch Zählen in einer Neubauer-Kammer nach Anfärbung toter Zellen mit Tryphan-Blau ermittelt.

YPEN-I-Endothelzelllinie aus der Ratte (101): adhärent wachsend; Adenovirus-12 SV40-Hybridvirus transfiziert (American Type Culture Collection, Manassas USA). Zur Gewährleistung homologer Bedingungen (gleichbleibender Grad an Subkonfluenz in allen Experimenten) wurde ein Aliquot (ca. 0.5×10^7 Zellen) in einer Zellkulturflasche (162 cm²) in Kultur genommen. Nach 24 h wurde mit 10 ml PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, Gibco, Karlsruhe) gewaschen und der Zellrasen durch Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe) und anschließender Inkubation (3 min; 37°C) abgelöst. Zur Deaktivierung von Trypsin wurde 5 ml RPMI-Vollmedium zugegeben. Nach Zentrifugation (1000 U/min, 5 min) wurde das Endothelzellpellet in 20 ml Vollmedium resuspendiert und jeweils 10 ml in einer Zellkulturflasche (75 cm²) für weitere 48 h kultiviert. Geerntet wurde durch vorsichtiges Abschaben vom Boden der Zellkulturflaschen.

N9-Mikroglia-Zelllinie aus der Ratte (111): adhärent wachsend; Adenovirus 12 SV40 Hybridvirus transfiziert (American Type Culture Collection, Manassas USA). Die Zelllinie wurde unter Standardbedingungen kultiviert und in subkonfluentem Zustand geerntet. Das Ernten der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche mit einem Zellschaber.

C6-Glioblastom-Zelllinie aus der Ratte (5): adhärent wachsend (ATCC (American Type Culture Collection, Manassas USA). Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen.

Die Zellen wurden durch Ablösen des subkonfluenten Zellrasens mit Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe) geerntet.

1.2 Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen, die nicht Bestandteil kommerzieller Testsysteme waren, sind in Tab. 1 aufgeführt. Allgemein übliche Puffer und Lösungen (TBS, PBS, LB-Medium) wurden analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift (147) hergestellt.

Tab. 1 Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Rezept
Selektionspuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.1% NaN ₃
Waschpuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.1% NaN ₃ , 0.2% BSA
B&W-Puffer (2x):	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 2.0 M NaCl
Ladepuffer :	4 ml H ₂ O, 1 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.8 ml Glycerol, 1.6 ml SDS (10%), 0.2 ml Bromphenol-Blau. Vor Gebrauch 950 µl Ladepuffer mit 50 µl β-Meraptoethanol mischen.
Lysepuffer P':	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Lösungen zur Plasmid-Präparation:	
Lsg. I:	25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA
Lsg. II:	0.2 M NaOH, 1% SDS
Lsg. III:	60 ml Kaliumacetat (5 M), 11.5 ml Eisessig, 22.5 ml H ₂ O

1.3 SELEX-Bibliothek und Oligonukleotide

Die synthetisch hergestellte und HPLC-gereinigte ssDNA-Bibliothek (148) (MWG-Biotech AG, Ebersberg) enthielt eine zentrale 60-Nukleotid (nt) lange Sequenz zufälliger Basenabfolgen, flankiert von jeweils 18-nt langen Primer-Hybridisierungsstellen (5'- ATA CCA GCT TAT TCA ATT -| 60-nt |- AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'). Die im Zuge der PCR verwendeten Primerpaare zur Herstellung (*i*) von fluoreszenzmarkierten ssDNA-

Sequenzen, (ii) von dsDNA zur Klonierung in Plasmide und (iii) zur Herstellung biotinylierter Aptamere sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2. Zur PCR-Verstärkung verwendete Primer^[♦]

	zur Herstellung fluoreszenz- markierter ssDNA- Bibliotheken	zur Klonierung individueller Aptamere nach erfolgreicher Selektion	zur Herstellung individueller fluoreszenzmarkierter ssDNA-Sequenzen	zur Herstellung individueller, biotinylierter Aptamere
5'-Primer:	5'-X-ATA CCA GCT TATTCA ATT-3';			
3'-Primer:	5'-Y-AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3'			
Modifikation				
X	FITC-18C ^[v]	–	FITC-18C	trB
Y	trB ^[*]	–	trB	–

^[♦] modifizierte Primer wurden von Operon Technologies Inc. (Alameda, USA), unmodifizierte Primer von MWG-Biotech AG (München) bezogen. – ^[v] Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) mit dem 5'-Ende, verbunden durch 18-Kohlenstoff-Ethylen-Glycol (18C); – ^[*] dreifache Biotin-Markierung (trB).

Alle Schritte mit FITC-markierter DNA wurden in lichtgeschützten (ambra) Reaktionsgefäßen durchgeführt (Eppendorf GmbH, Hamburg).

1.4 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Mix (200 µl/Reaktion): 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% Triton X-100, jeweils 200 µM an dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Promega, Mannheim); 1.9 mM MgCl₂ (Promega, Mannheim); jeweils 0.6 µM an 5'- und 3'-Primer (siehe Tab. 2).

PCR-Programm: 3 min 80°C, 2 min 94°C, 5 min 46°C. Bei 46°C erfolgte die Zugabe von 1 µl Taq DNA Polymerase (Promega, Mannheim). Es wurden 28 Zyklen à 1 min 94°C, 1 min 46°C, 1 min 72°C, gefolgt von 10 min bei 72°C durchgeführt (Biometra, Trio-Thermoblock). Die theoretische Produktausbeute betrug 120 pmol pro Reaktion (200 µl). Die Qualität der PCRs wurde durch Analyse von 10 µl PCR-Produkt auf 1.2% Agarosegel kontrolliert.

1.5 Dynabeads®-M-280-Streptavidin vermittelte Darstellung von ssDNA-Aptameren durch Doppelstrangtrennung

Die Darstellung FITC-modifizierter ssDNA-Sequenzen (FITC-18C-96 dNTPs) erfolgte ausgehend von doppelmarkiertem PCR-Produkt (siehe Abb. 1). Die Fixierung der magnetischen Kügelchen (Dynabeads®-M-280-Streptavidin; Dynal, Hamburg) erfolgte in einem Magnetständer (Dynal MPC-M).

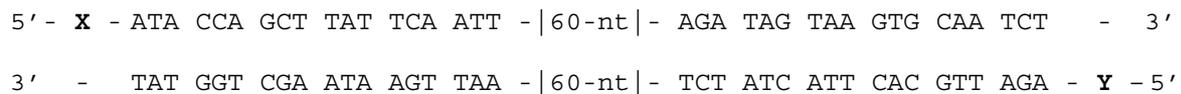


Abb. 1. doppelmarkiertes PCR-Produkt (X = FITC-18C, Y = trB)

Zur Fixierung von 200 pmol PCR-Produkt wurden 300 µl Dynabeads® (10 mg/ml) eingesetzt. Die Dynabeads® wurden nach dreimaligem Waschen mit jeweils 500 µl B&W-Puffer, schließlich in 400 µl B&W-Puffer (2-fach konz.) aufgenommen und zusammen mit 400 µl PCR-Produkt (theoretische PCR-Ausbeute 240 pmol) inkubiert (30 min, RT). Die Dynabead®-dsDNA-Komplexe wurden erneut dreimal gewaschen (mit jeweils 500 µl B&W-Puffer) und die dsDNA durch Inkubation (15 min; RT) in 15 µl NaOH (0.15 M) denaturiert. Der magnetische Matrizenstrang (Abb. 1, Y = trB) wurde im Magnetständer immobilisiert und der alkalische – die fluoreszenzmarkierte ssDNA (Abb. 1, X = FITC-18C) enthaltende – Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Dynabeads® wurden nacheinander mit 15 µl NaOH (0.15 M) und 30 µl Selektionspuffer gewaschen. Die Waschlösungen wurden mit dem alkalischen Überstand vereinigt, mit 30 µl 0.15 M HCl neutralisiert und mit 110 µl Selektionspuffer (2-fach konz.) auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Der pH wurde kontrolliert (pH 7.4) und die ssDNA-Konzentration am UV-Spektrometer bestimmt (Perkin Elmer, UV/Vis Spectrometer Lambda 1; $1 \text{ OD}_{260} \cong 33 \text{ µg/ml}$). Verdünnt mit dem entsprechenden Volumen an Selektionspuffer (1-fach konz.) diente diese Lösung als Stock zur Herstellung von Aptamerlösungen der gewünschten Molarität.

1.6 Plasmid-Präparation (Alkalische Lyse)

Jeweils 2 ml rekombinante *E. coli*-Kulturen (optische Dichte: 600 OD) wurden abzentrifugiert (12 000 U/min, 30s) und das Zellpellet für 15 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde zur Lyse in 100 µl eisgekühlte Lsg. I (siehe S.66, Tab. 1) resuspendiert und nach Zugabe von 200

μl Lsg. II vorsichtig gemischt. Der Suspension wurden 150 μl eiskalte Lsg. III zugegeben und 10 s geschüttelt. Die Reaktion wurde für 3 – 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 U/min, 5 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μl Phenol/Chloroform (50/50) geschüttelt. Nach Zentrifugation (12 000 U/min, 2 min) wurde der Überstand erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das darin enthaltene Plasmid durch Zugabe von 500 μl Ethanol gefällt (2 min Inkubation bei RT). Das gefällte Plasmid wurde abzentrifugiert (12 000 U/min, 4°C) und bei RT für 10 min getrocknet.

1.7 Restriktionsanalyse

Das Plasmidpellet wurde in 25 μl H₂O unter Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase (Biorad) gelöst. Jeweils 5 μl dieser Lösung wurden zur Restriktionsanalyse eingesetzt. Die Restriktion erfolgte mit EcoRI-Schneidenzym: Dazu wurden 5 μl Plasmid, 1 μl EcoRI-Puffer, 1 μl EcoRI-Schneidenzym und 3 μl H₂O für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 2 μl Bromphenol-Blau und die elektrophoretische Kontrolle auf 1.2%igen Agarosegel erlaubte die Identifizierung einzelner Plasmide mit einem Insert von ca. 100 Basenpaaren.

1.8 Präparation von Gewebeschnitten

1.8.1 C6-Glioblastom-Modell der Ratte

Sprague Dawley-Ratten wurden mit Ether narkotisiert, die knöcherne Schädeldecke freigelegt und die obere rechte Hemisphäre durchbohrt. Der Schädel wurde in einem Stereotaxierahmen fixiert (ASI Instruments, Small Animal Stereotaxic Frame) und $2 - 2.5 \times 10^4$ C6-Glioblastomzellen (in 100 μl PBS) intrakraniell transplantiert. Die Injektion erfolgte stereotaktisch innerhalb eines Zeitraumes von 1 min. Die Ratten wurden 23 Tage nach der Transplantation mit PBS perfundiert, die Hirne entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

1.8.2 EAE-Modell der Ratte

EAE wurde in Lewis-Ratten durch die Injektion einer Emulsion von 100 μl Freuds Adjuvant (Endkonzentration des Mycobakterium Tuberkolosis: 1 mg/ml) und von 50 μg des Peptides MBP68-84 (YGSLPQKSQRSQDENPV) induziert. Die Ratten wurden 14 Tage nach der

Immunisierung mit PBS perfundiert, die Hirne entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Rattenhirne der beiden Tiermodelle sowie Hirne von Normaltieren wurden unmittelbar vor den histologischen Untersuchungen am Mikrotom (Microm, HM-500-OM) in 10 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger überführt. Bereiche des zellreichen Tumors bzw. zellreiche Gewebeeinfiltrate wurden durch Hämalaun-Eosin-Färbung identifiziert.

1.9 SELEX – Selektion von ssDNA gegen YPEN-1-Endothelzellen

Die Anreicherung von Aptamerliganden gegen YPEN-1-Endothelzellen in den Bibliotheken der aufeinander folgenden Selektionsrunden wurde wie folgt durchgeführt:

1.9.1 Erste Selektionsrunde

Synthetische Startbibliothek (17 µl, 100 pmol/µl) wurde in 1 ml Selektionspuffer aufgenommen, bei 80°C im Wasserbad denaturiert (10 min) und anschließend bei 0°C renaturiert (10 min). Zur Unterdrückung der Hintergrundbindung von ssDNA (sowohl an die Zellen als auch an die Gefäßwand der Reaktionsgefäße) wurden 8 nmol Hefe-tRNA (Gibco, Karlsruhe) und 8 nmol Rinderserumalbumin (BSA; Merck, Darmstadt) zur Startbibliothek gegeben. Zur Reduktion der Koselektion von Endothelzell-unspezifischen Aptameren wurde die Startbibliothek mit 3×10^7 N9-Mikrogliazellen in Polypropylen-Reaktionsgefäßen inkubiert (30 min, 37°C). Die Aptamer-N9-Mikroglia-Zellkomplexe wurden abzentrifugiert (5 min; 1000 U/min) und der Überstand mit 1×10^6 YPEN-1 inkubiert (30 min, 37°C). Die Abtrennung von freier ssDNA erfolgte durch dreimaliges Waschen (jeweils 1 ml Waschpuffer) und Zentrifugieren (1000 U/min, 5 min). Das Endothel-Aptamer Zellpellet wurde in 90 µl Ampuwa resuspendiert und in Aliquots à 3 x 30 µl direkt zur PCR-Amplifikation eingesetzt. Die PCR erfolgte in drei Reaktionen à 200 µl, gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.4. Die Qualität der PCRs wurde gelelektrophoretisch auf das Vorhandensein einer einzelnen Bande von ca. 100 Basenpaaren (1.2%, Agarosegel) kontrolliert. Die drei vereinigten PCRs wurden mit 4 mg Dynabeads[®] in 600 µl B&W-Puffer (2-fach konz.) für 30 min bei RT inkubiert. Die FITC-18C-markierte ssDNA-Bibliothek der zweiten Selektionsrunde wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.5 hergestellt.

1.9.2 Zweite bis siebte Selektionsrunde

Die FITC-18C-ssDNA-Bibliothek der vorangegangenen Selektionsrunde (200 pmol in 200 µl Selektionspuffer) wurde zunächst denaturiert (80°C, 10 min) und renaturiert (0°C, 10 min), mit 1 nmol Hefe-tRNA und 1 nmol BSA zur Unterdrückung der Hintergrundbindung versetzt und anschließend mit 3×10^7 N9-Mikrogliazellen inkubiert (30 min, 37°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit 1×10^5 YPEN-1-Endothelzellen inkubiert (30 min, 37°C). Das Endothelzell-Aptamer-Pellet wurden dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen, in 500 µl Selektionspuffer aufgenommen und die Zellbindung von FITC-18C-markierten Aptameren am Durchflusszytometer (FACScan, BD, Heidelberg) durch die Messung von 5000 Ereignissen analysiert. Zur PCR-Verstärkung (analog der Vorschrift 1.4) wurde das Endothelzell-Aptamer-Pellet erneut abzentrifugiert, in 150 µl Ampuwa resuspendiert und jeweils 30 µl direkt als Template eingesetzt. Die drei vereinigten PCRs wurden mit 4 mg Dynabeads in 600 µl B&W-Puffer (2-fach konz.) für 30 min bei RT inkubiert. Die FITC-18C-markierte ssDNA-Bibliothek der jeweils folgenden Selektionsrunde wurde gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.5 hergestellt.

Zur Unterdrückung der Koselektion von Aptameren gegen die Matrix der Inkubationsgefäße wurden die bis einschließlich der dritten Selektionsrunde verwendeten Polypropylengefäße ab der vierten Selektionsrunde durch Polyethylengefäße ersetzt.

1.9.3 Achte Selektionsrunde

Die Durchführung der achten Selektionsrunde erfolgte im Wesentlichen wie unter 1.9.2 beschreiben. Zur Klonierung der PCR-Produkte in pCRII-Plasmide wurde die PCR jedoch mit unmodifizierten Primern durchgeführt (siehe Tab. 2).

1.9.4 Bereitstellung individueller FITC-18C-markierter Aptamere aus der Bibliothek der achten Selektionsrunde

Die PCR-Produkte aus der achten Selektionsrunde wurden unter Verwendung des „TA-Cloning Mini-Kits“ (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in ein pCRII-Plasmid ligiert und dieses in kompetente *E. coli* transformiert. Nach Ausplattieren der Transformanten auf Agar-Agar und der Isolierung einzelner *E. coli*-Kolonien wurden diese in LB-Medium vermehrt (37°C, ca. 18 h) (149). Die Plasmide individueller Klone in *E. coli* wurden gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.6 isoliert und nach erfolgter Restriktionsanalyse (analog der

Vorschrift 1.7) mittels PCR mit modifizierten Primern (X = FITC-18C, Y = trB; siehe Tab. 2) gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.4 amplifiziert. Die Herstellung individueller fluoreszenzmarkierter Aptamere erfolgte wie in Kap. 1.5 beschrieben. Die *E. coli*-Transformanten wurden in LB-Medium mit 10% DMSO bei -80°C gelagert.

1.10 Dekonvolution-SELEX (erster Schritt): Durchflusszytometrische Analyse individueller Aptamere

5×10^4 YPEN-1-Endothelzellen bzw. 5×10^4 N9-Mikrogliazellen wurden jeweils mit denaturiertem und renaturiertem FITC-18C-markiertem Aptamer in 200 µl Selektionspuffer (0.25 pmol/µl, 1 µg/µl tRNA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen und ihre Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer durch die Messung von 10 000 Ereignissen analysiert.

1.11 Dekonvolution-SELEX (zweiter Schritt): Histologische Analyse individueller Aptamere auf Gewebeschnitten

Zur Analyse der Färbemuster individueller FITC-18C-markierter Aptamere auf Gewebeschnitten des C6-Glioblastoms, der EAE und des Normalhirns der Ratte wurden diese zunächst mit Hefe-tRNA beschichtet (1 µg/µl in Selektionspuffer) und bei 4°C für 20 min inkubiert. Nach Waschen der Gewebeschnitte in Selektionspuffer wurden diese mit einer Lösung des zu testenden FITC-18C-markierten Aptamers (0.25 pmol/µl in Selektionspuffer, 1 µg/µl tRNA) für 40 min bei RT inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 20-50 µl Fluoreszenzquencher (Vectashield, Mounting Medium 4-1000) überschichtet und mit einem Deckglas eingeschlossen. Die Fluoreszenzmuster wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Mikroskop BX 60 der Fa. Olympus, ausgestattet mit einer Olympus Quecksilberdampf Lampe U-RFL-T und Olympus Fluoreszenzfilter U-MNU für FITC-Fluoreszenz). Zur Auswertung und Archivierung der gefärbten Gewebeschnitte wurde mit der Kamera OM-4 Ti der Fa. Olympus fotografiert.

2 Charakterisierung von Aptamer III.1

2.1. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die C6-Glioblastom-Gewebeschnitte nach der allgemeinen Vorschrift 1.11 mit Aptamer III.1 gefärbt und anschließend mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochlorid (DAPI, 300 nM; Molecular Probes, Leiden) 2 – 3 min bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten in Waschpuffer und Auftragen von ProLong™ Antifade-Fluoreszenzquencher (Molecular Probes, Leiden) wurde das Fluoreszenzmuster mikroskopisch untersucht (Fluoreszenzfilter der Fa. Olympus: U-MWIB für DAPI-Fluoreszenz und U-MNU für FITC-Fluoreszenz). Bilder der Doppelfärbungen mit DAPI und FITC wurden durch nachträgliche Bildbearbeitung (Jasc Software, Paint Shop Pro™ V.6.02) überlagert.

2.2 Doppelmarkierung von Endothelzellen mit CD-31

Zur Doppelmarkierung von Endothel mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) CD-31 (Dako, Hamburg) und FITC-18C-markiertem Aptamer III.1 wurden die Gewebeschnitte zunächst wie unter 1.11 beschrieben mit Aptamer III.1 gefärbt und anschließend mit CD-31 (aus der Maus, Verdünnung 1/1000, 1 h, RT) inkubiert. Zur Visualisierung von gebundenem CD-31 wurde Cy™₃ Sekundär-Antikörper (anti-mouse) der Fa. Amersham (Buckinghamshire) mit einer Verdünnung von 1/2000 auf den Schnitt aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschritten in Waschpuffer und Auftragen von Fluoreszenzquencher (Vectashield, Mounting Medium for Fluorescence 4-1000) wurde das Fluoreszenzmuster mikroskopisch untersucht (Fluoreszenzfilter der Fa. Olympus: U-M51006 F/TR für FITC- und Cy™₃-Fluoreszenz).

2.3 Verletzen einer konfluenten Endothelzellschicht

Das Setzen einer Läsion wurde in einer Petrischale durchgeführt. Einer konfluenten Monozellschicht von YPEN-1-Endothelzellen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze an mehreren Stellen vorsichtig einige Zellen entnommen und die Zellkultur für weitere 4 h kultiviert. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 2–3 ml Selektionspuffer wurde der Zellrasen mit MeOH fixiert. Dazu wurden 2–3 ml MeOH (auf -20°C vorgekühlt) auf den Zellrasen getropft und für 10 min bei -20°C inkubiert. Das MeOH wurde abgesaugt, der Zellrasen für 10 min bei RT getrocknet und anschließend mit FITC-markiertem Aptamer für 30 min bei

37°C gefärbt (0.25 pmol/µl in Selektionspuffer mit 1 µg/µl tRNA). Das Färbemuster wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

2.4 H₂O₂-Stimulation einer konfluenten YPEN-1-Endothelzellkultur

Eine konfluente YPEN-1-Monozellschicht wurde zweimal mit 10 ml RPMI-1640 gewaschen und mit H₂O₂ (1 mM in RPMI-1640) für 15 min bei 37°C unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen und für weitere 4 h in RPMI-Vollmedium rekultiviert. Im Anschluss erfolgte die Färbung gemäß der allgemeinen Vorschrift 1.10 mit FITC-18C-markiertem Aptamer III.1.

2.5 Identifizierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1

2.5.1 Beschichtung von Dynabeads[®] mit Aptamer III.1

200 pmol biotinyliertes (trB) Aptamer III.1 (2 µl, 100 pmol/µl, Operon Technologies) wurde in 1 ml Selektionspuffer de- und renaturiert und mit 1 mg Dynabeads[®] für 30 min bei RT inkubiert. Die Dynabeads[®]-Aptamer III.1-Komplexe wurden anschließend dreimal mit 1 ml Selektionspuffer gewaschen, in 1.3 ml Selektionpuffer resuspendiert und das gesamte Volumen in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Negativkontrolle erfolgte die Beschichtung von Dynabeads[®] mit unselektierter, biotinylierter ssDNA (trB-ssDNA) in Analogie zu Aptamer III.1.

2.5.2 Herstellung von YPEN-1-Endothelzelllysat

Die subkonfluente YPEN-1-Endothelzellschicht dreier Zellkulturflaschen (162 cm²) wurde jeweils mit 15 ml PBS gewaschen. Für jede Zellkulturflasche wurden 200 µl des unspezifischen Proteinasehemmers Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 100 mM in Isopropanol) in 20 ml eisgekühltem PBS gelöst, auf den Zellrasen pipettiert und dieser sofort mit einem Zellschaber abgelöst. Die aus den drei Zellkulturflaschen vereinigten Endothelzellen (ca. 1.5×10^8) wurden abzentrifugiert (1700 U/min, 5 min, 4°C). Zwischenzeitlich wurde 1 ml Lysepuffer P' (siehe Tab. 1) mit jeweils 2 µl der spezifischen Proteaseinhibitoren Aprotinin (2 µg/ml) und Leupeptin (2 µg/ml) sowie 7 µl PMSF (100 mM in Isopropanol) versetzt (Proteaseinhibitoren müssen vor jedem Experiment frisch aufgetaut und zugegeben werden). Das Zellpellet wurde in 200 µl dieses Puffers resuspendiert, in ein 1

ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Inkubation (15 min, 0°C) lysiert. Die schwereren Membran- und Gerüstproteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 13000 U/min, 4°C) pelletiert, die kleineren löslichen Proteine im Überstand wurden verworfen. Das Proteinpellet wurde in 400 µl Selektionspuffer aufgenommen und mit gepulstem Ultraschall (Bandelin Electronic, UH70) behandelt (20 s, 0°C).

2.5.3 Isolierung der molekularen Zielstruktur von Aptamer III.1

Das in 400 µl Selektionspuffer resuspendierte YPEN-1-Proteinpellet aus 2.5.2 wurde in Anwesenheit von 20 nmol Hefe-tRNA mit den mit Aptamer III.1-beschichteten Dynabeads[®] (vorliegend in 1300 µl Selektionspuffer, siehe Kap. 2.5.1) für 15 min bei 0°C inkubiert (gelegentliches Schütteln des Inkubats verhinderte die Sedimentation von Protein und Dynabeads[®]). Die Dynabeads[®]-Aptamer-Protein-Komplexe wurden im Magnetständer fixiert und der Überstand abgesaugt. Die Komplexe wurden in 500 µl Selektionspuffer (150 mM NaCl) resuspendiert, in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit 200 µl Selektionspuffer (100 mM NaCl, mit 2 nmol Hefe-tRNA) gewaschen. Die gewaschenen Dynabead[®]-Komplexe wurden zur Isolierung von Aptamer-gebundenen Proteinen in 30 µl 1M NaCl resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Magnetständer wurden die Dynabeads[®] erneut fixiert und der Überstand mit isoliertem Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Dynabeads[®] wurden mit 20 µl Ladepuffer gewaschen, die Waschfraktion mit den 30 µl Proteinüberstand vereinigt und 10 min im Wasserbad gekocht. Die in Ladepuffer vorliegenden Proteine wurden nach Elektrophorese auf 12% Polyakrylamidgel und Färbung mit Comassie-Blau analysiert.

2.5.4 Massenspektrometrische Charakterisierung des isolierten Proteins

Die Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, vollständig entfärbt und mit 67 ng/µl Trypsin (aus dem Schwein, Promega, Mannheim) in 25 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8.1) verdaut (37°C, 3 h). Die Peptidmischung wurde aus dem Gel mit Trifluoressigsäure / H₂O (Vol%: 50/50) und Trifluoressigsäure/Acetonitril (Vol%: 50/50) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden vakuumgetrocknet, in 0.1% Trifluoressigsäure gelöst und durch eine ZipTip_{C18}[™]-Pipettenspitze (Millipore) gereinigt. Die Peptide wurden mit 10 µl Lösung aus MeOH/Ameisensäure (Vol%: 50/1) eluiert. Ihre Sequenzierung erfolgte durch Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie auf einem Hybrid-Quadrupol-Time of

Flight-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer Nanoflow-Electrospray-Ionisierungsquelle (nano-ESI-Q-ToF, Micromass, Manchester, England). Die goldbeschichteten Nanoflow-Kapillarnadeln (Type Medium Nano-ESI-Spray-Capillaries for the Micromass Q-ToF) wurden von Protana (Dänemark) bezogen. Die Nadel wurde mit 3 μ l der Probe gefüllt und anschließend durch das Abbrechen des spitz zulaufenden Endes unter einem Mikroskop geöffnet. Eine konstante Zerstäubung wurde durch das Anlegen einer Nadelspannung von 1200–1400 V, einem Druck von 2 PSI und einer Temperatur von 40°C erreicht. Die ermittelte Flussrate betrug 20–50 nl/min. In den NanoFlow-ESI MS/MS-Experimenten wurde die Peptid-Fragmentierung durch Beschuss mit Argon-Atomen erreicht. Die Integrationszeit des TOF-Analysators betrug 1 s mit einer Interscan-Verzögerung von 0.1 s. Die Datenbankrecherche (NCBIInr) wurde unter Verwendung der MASCOT-Software von Matrix Science durchgeführt (150).

3 Daten individueller FITC-18C-markierter Aptamere

3.1 Die aktivierte Mikrovaskulatur der pathologischen BHS bindende Aptamere

Von den 21 Aptameren, die in vergleichenden histologischen Studien zwischen C6-Glioblastom- und Normalhirn-Gewebeschnitten bzw. zwischen EAE- und Normalhirn-Gewebeschnitten ausschließlich die pathologische Mikrovaskulatur erkannten, sind in diesem Kapitel a) die Sequenzen, b) die FACS-Diagramme (Fluorescence Activated Cell Sorter) und jeweils ein histologisches Färbebeispiel von c) C6-Glioblastom- und d) EAE-Gewebeschnitten aufgelistet.

a) Die Ermittlung der Basensequenz dieser 21 Aptamere erfolgte in Auftragsarbeit (151) mittels „automatisierter Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung“ (AFLs).

b) Endothelzell-bindende FITC-18C-markierte ssDNA wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschriften 1.9.1 – 1.9.3 in der Bibliothek der achten Selektionsrunde angereichert und gemäß der Vorschrift 1.9.4 in individuelle Klone sortiert. Ihre Endothelzellbindung wurde wie unter 1.10 beschrieben am Durchflusszytometer (FACS) getestet (rote Kurven).

Unselektierte FITC-18C-markierte ssDNA (zur Berücksichtigung der unspezifischen Hintergrundbindung) wurden gemäß 1.9.4 aus der Startbibliothek isoliert. Ihre Endothelzell-Bindung wurde wie unter 1.10 beschrieben am FACS getestet (schwarze Kurven). [X-Achse: FITC-Fluoreszenzintensität (F); Y-Achse: Ereignisse(E)].

c) Sekundärstrukturen wurden mithilfe des „*DNA mfold servers*“ unter Berücksichtigung der NaCl-Konzentration (100 mM) und MgCl₂-Konzentration (1mM) berechnet. Die ermittelten Strukturen sind lediglich Strukturvorschläge (G-Quartett- und Pseudoknot-Motive werden von der Software nicht berücksichtigt) (152).

Für die histologischen Studien auf Gewebeschnitten wurden Endothel-bindende FITC-18C-markierte Aptamere gemäß der allgemeinen Vorschriften 1.9.1 – 1.9.3 angereichert und gemäß der Vorschrift 1.9.4 in einzelne Klone sortiert.

d) Die histologischen Färbungen von C6-Glioblastom-Gewebeschnitten erfolgten gemäß der Vorschrift 1.11. mit dem jeweiligen FITC-18C-markiertem Aptamer. Die Gewebeschnitte wurden nach der allgemeinen Vorschrift 1.8.1 hergestellt.

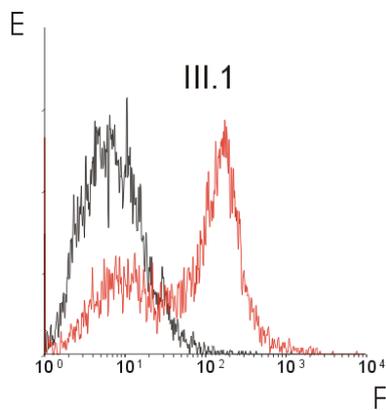
e) Die histologischen Färbungen von EAE-Gewebeschnitten erfolgten gemäß der Vorschrift 1.11. mit dem jeweiligen FITC-18C-markierten Aptamer. Die Gewebeschnitte wurden nach der allgemeinen Vorschrift 1.8.2 hergestellt.

3.1.1 Aptamer III. 1

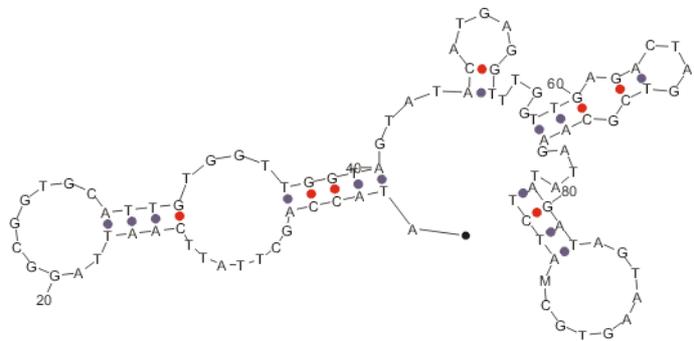
a) Sequenz:

5' – FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGG CGG TGC ATT GTG GTT GGT
AGT ATA CAT GAG GTT TGG TTG AGA CTA GTC GCA AGA TAT AGA TAG TAA
GTG CAA TCT – 3'

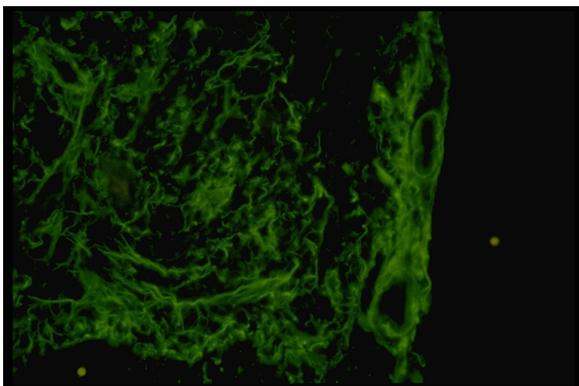
b) FACS-Histogramm



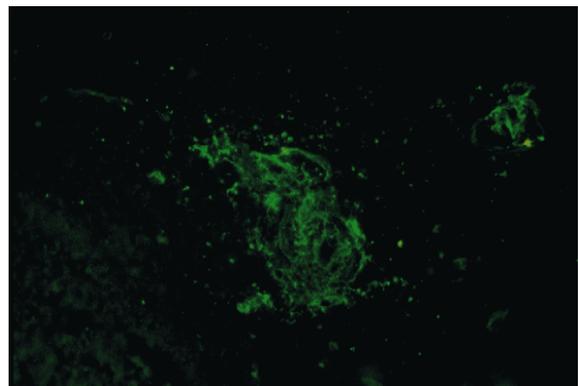
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

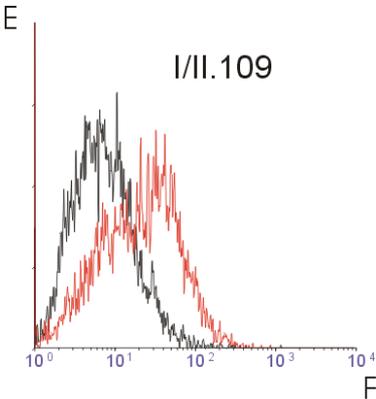


3.1.2 Aptamer I/II. 109

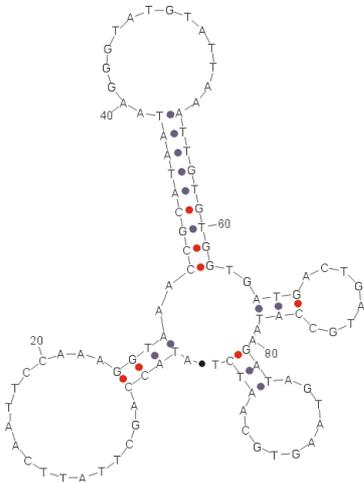
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCA AAG GTA AAC CGC ATA
ATA AGG GTA TGT ATT AAA TTG TGT GGT GAT GAC TGA TGC CAT A AGA
TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

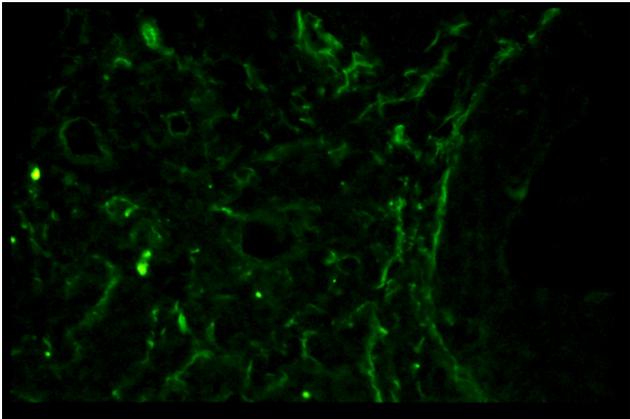
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

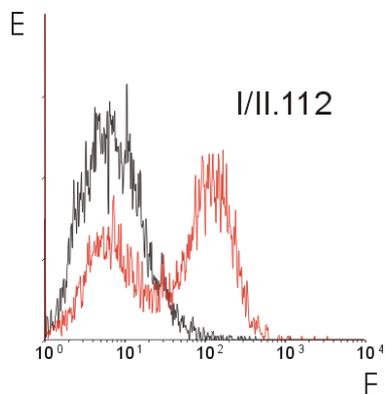
keine Strukturen erkannt

3.1.3 Aptamer I/II. 112

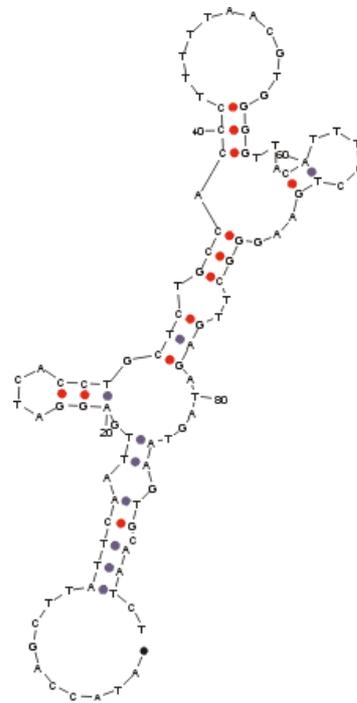
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GAG GAT CAC CTG CTC TGC
 CAC CCT TTT TAA CGT GGG GTT ACA TTT GCT GAA GGG CTT G AGA TAG
 TAA GTG CAA TCT - 3'

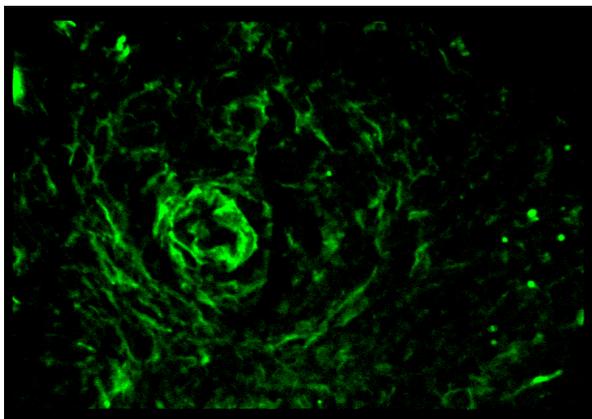
b) FACS-Histogramm



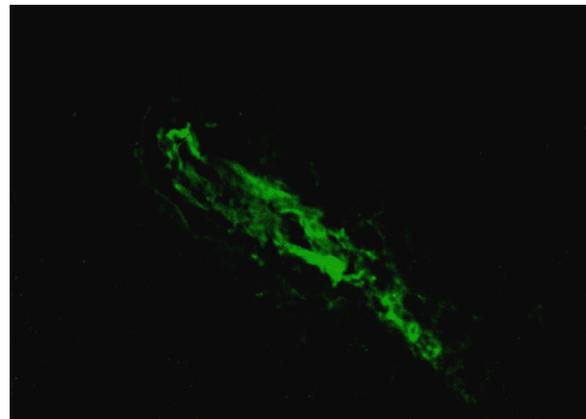
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

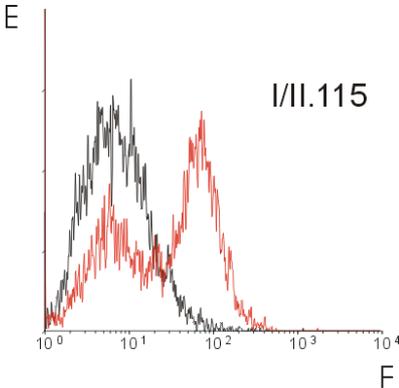


3.1.4 Aptamer I/II. 115

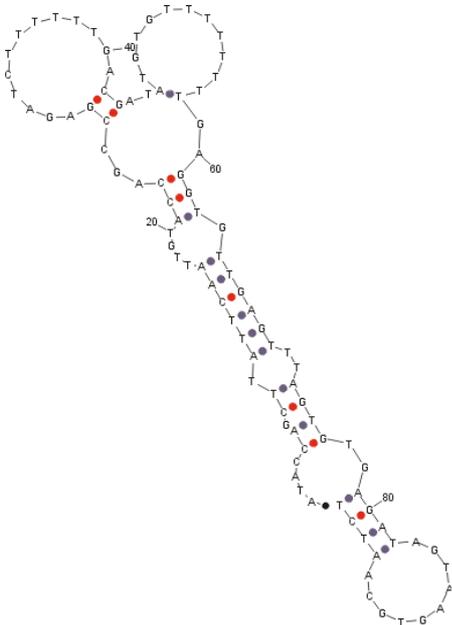
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GTA CCA GCC GAG ATC TTT
TTT GAC GAT ATG TGT TTT TTT TGA GGT GTT GAG TTT AGT GTG AGA
TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

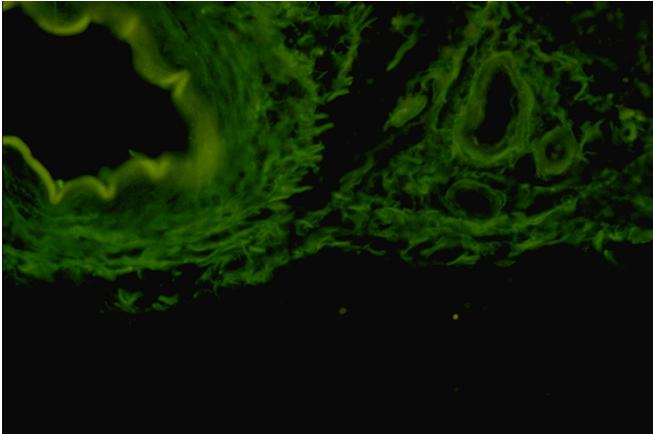
b) FACS-Histogramm



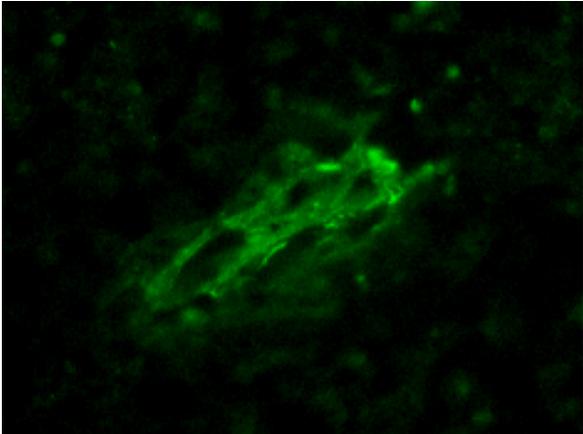
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

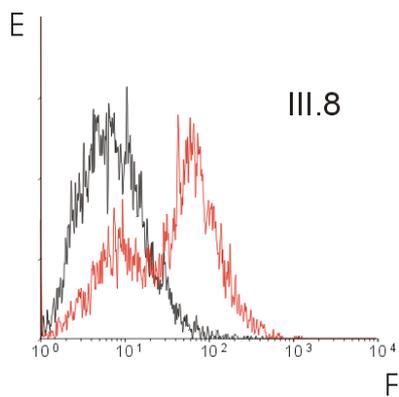


3.1.5 Aptamer III. 8

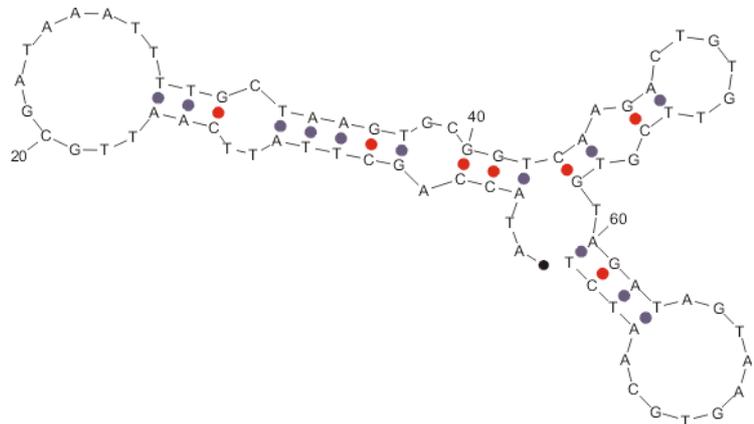
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCG ATA AAT TTT GCT AAG
TGC GGT CAA GAC TGT GTT CGT GT AGA TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

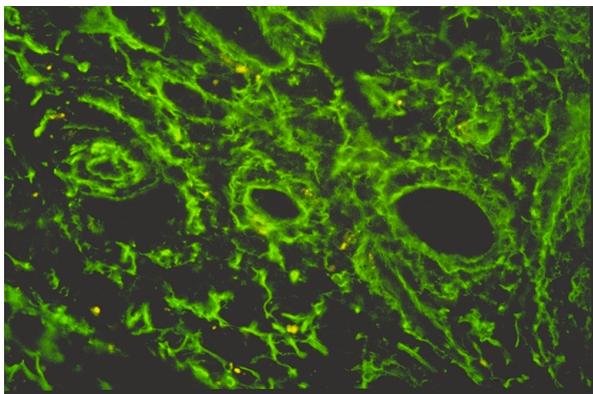
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

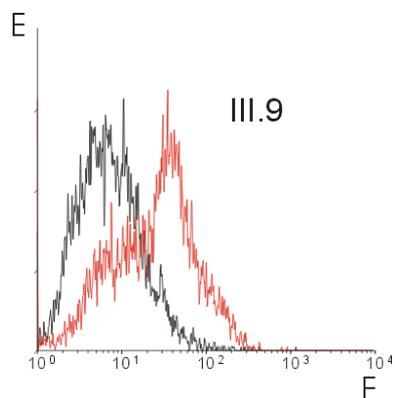
keine Strukturen erkannt

3.1.6 Aptamer III.9

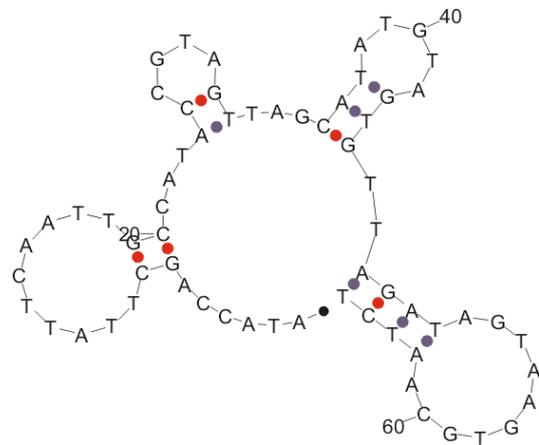
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCC ATA CCG TAG TTA GCA
TAT GTA GTG TT AGA TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

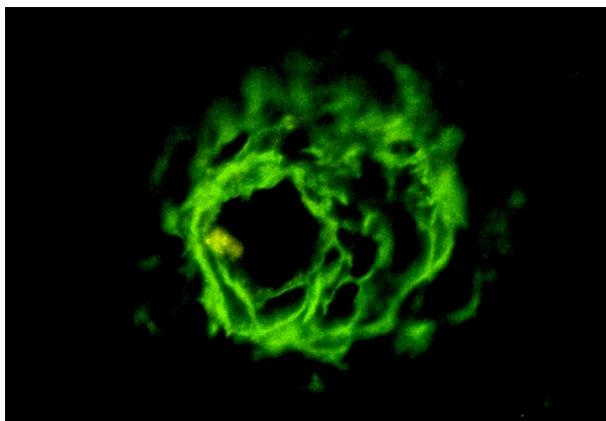
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

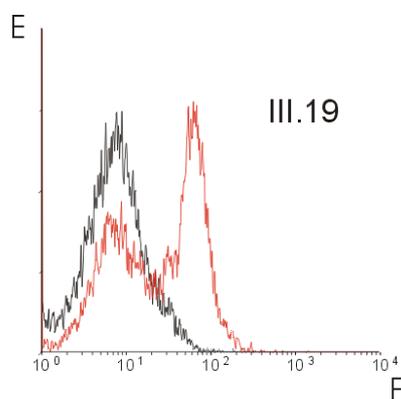
keine Strukturen erkannt

3.1.7 Aptamer III. 19

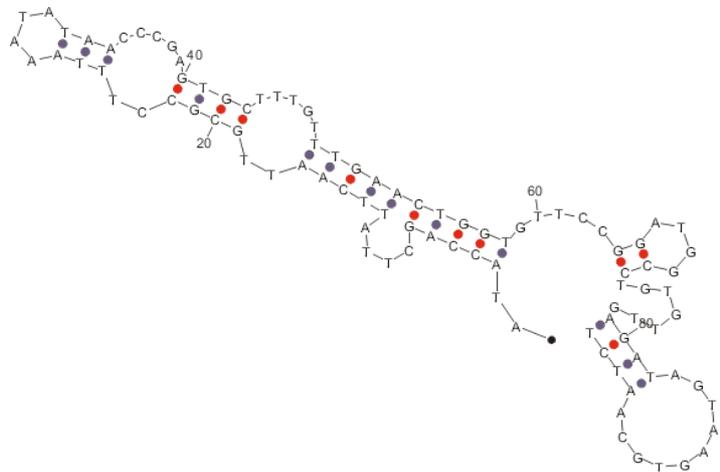
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCG CCT TTA AAT ATA ACC
 CGA GTG CTT TGT TTG AAC TGG TGT TCC GGA TGG CCT GTG TTG AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

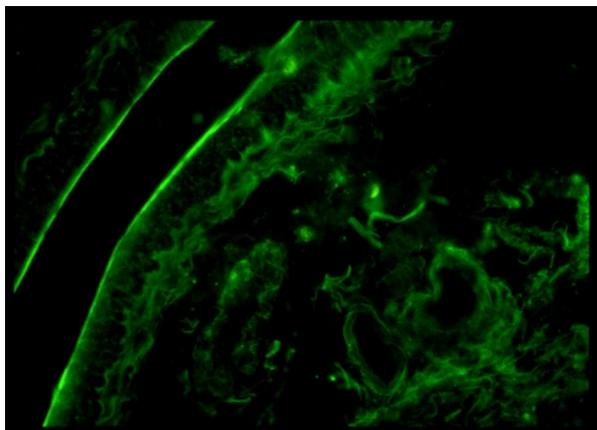
b) FACS-Histogramm



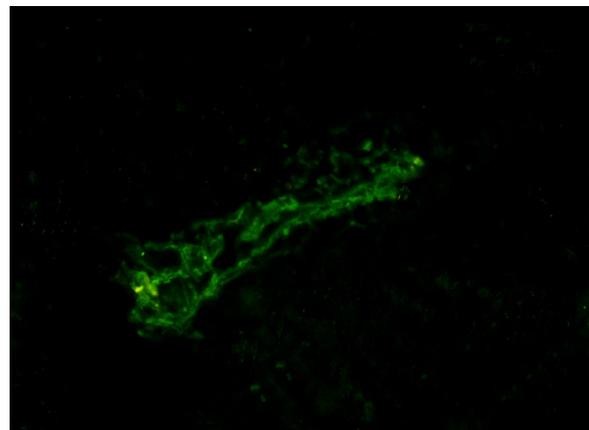
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

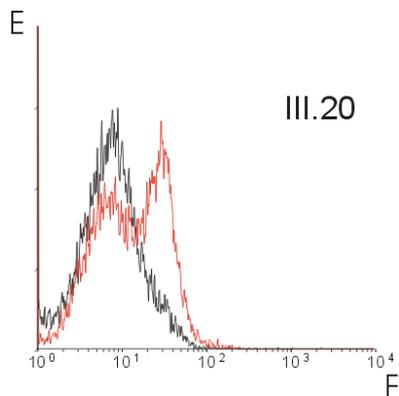


3.1.8 Aptamer III. 20

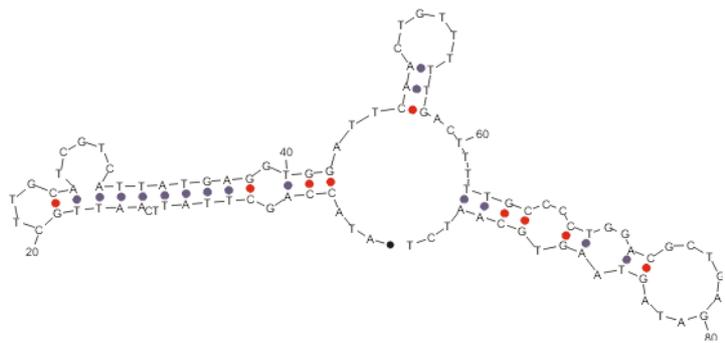
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCT TGC ATC GTC ATT ATG
 AGG TGG ATT CAA CT G TTT TTG ACT TTT TGC CCC TGG ACG CTG AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

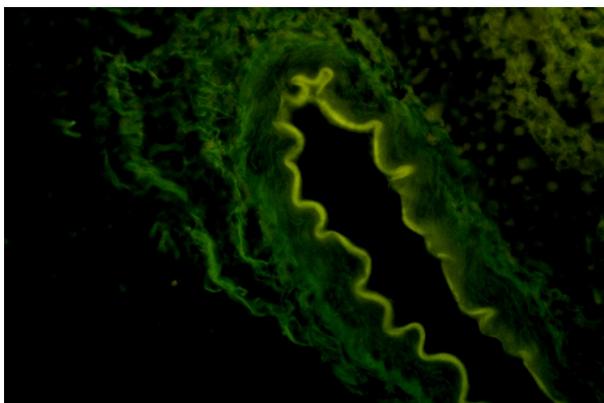
b) FACS-Histogramm



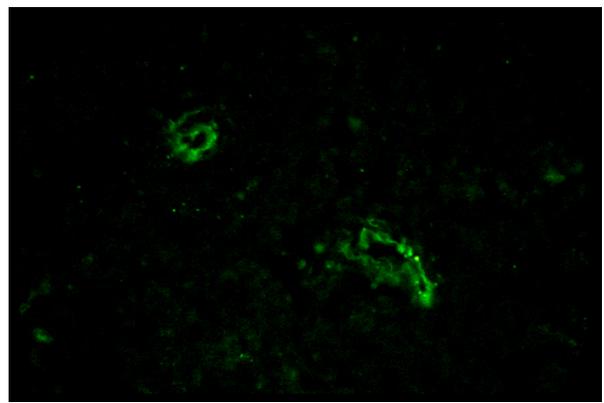
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

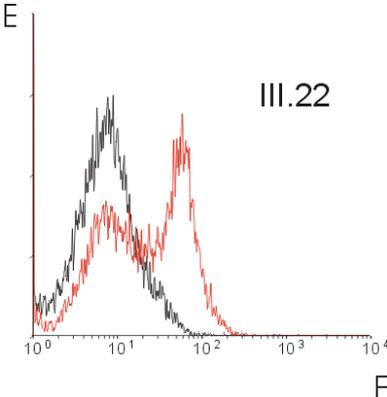


3.1.10 Aptamer III. 22

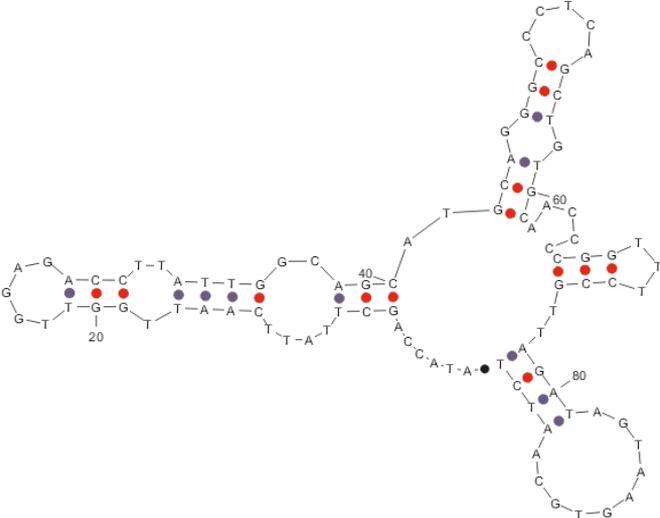
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGT TGG AGA CCT TAT TGG
CAG CAT GCA GGG CCC TCA GCT GTG CAA CCC CGG TTT CCG TT AGA TAG
TAA GTG CAA TCT - 3'

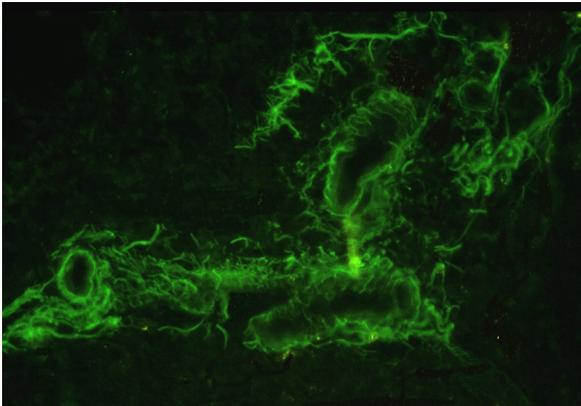
b) FACS-Histogramm



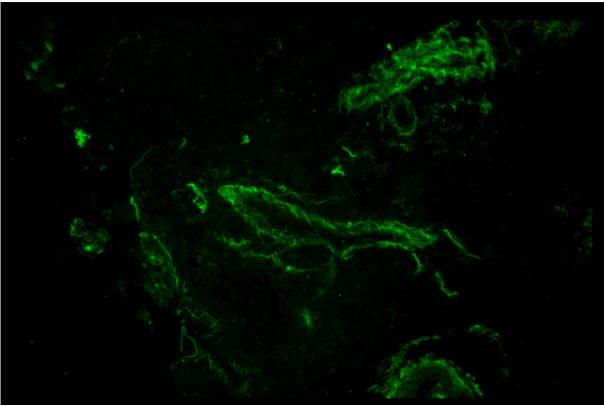
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

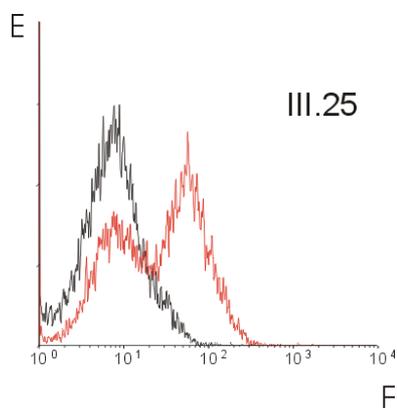


3.1.11 Aptamer III. 25

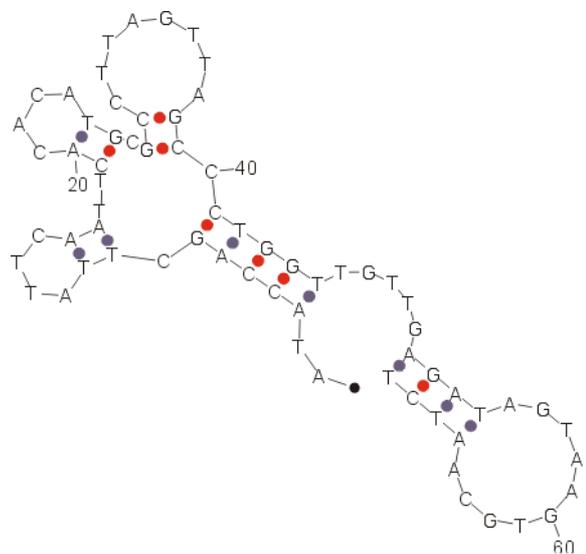
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CAC ACA TGC GCC TTA GTT
AGC CCT GGT TGT TG AGA TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

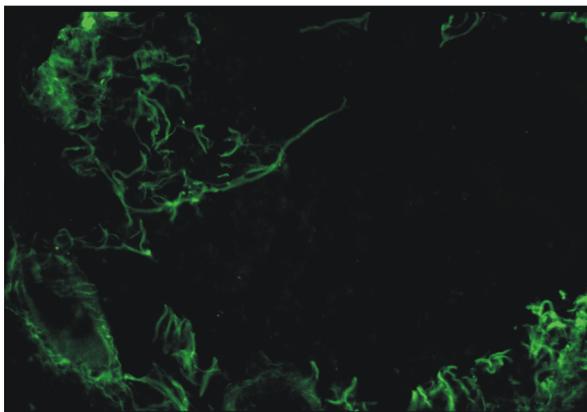
b) FACS-Histogramm



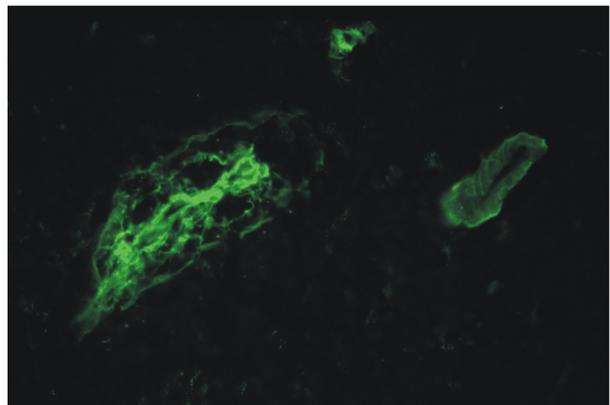
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

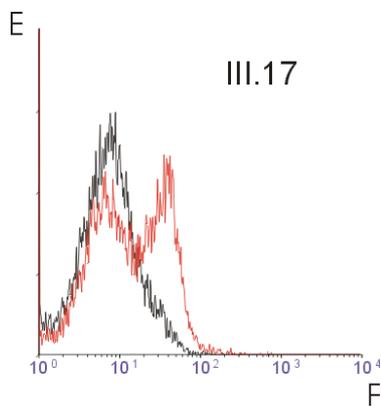


3.1.12 Aptamer III. 17

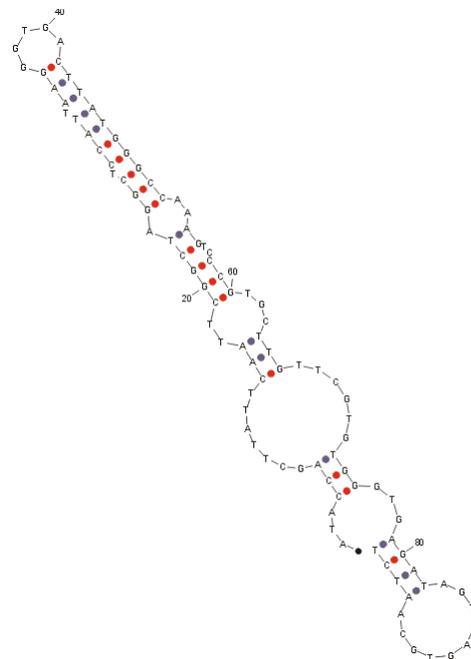
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CGG CTA GGC TCC ATT AAG
 GGT GAC TTA TGG GCC AAA GTC CCG TGC TTG TTC GTG TGG GTG AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

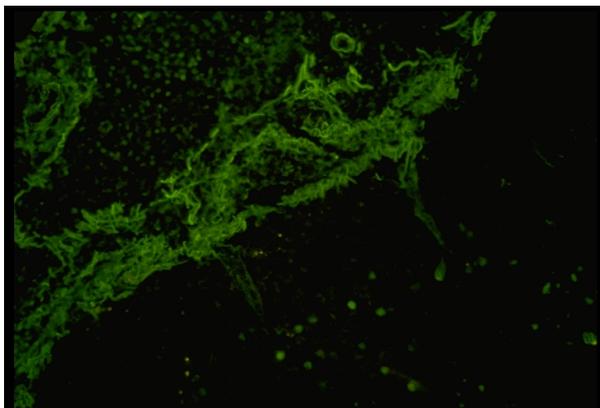
b) FACS-Histogramm



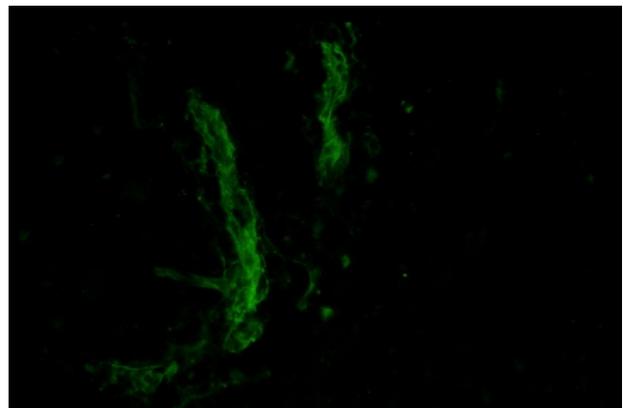
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

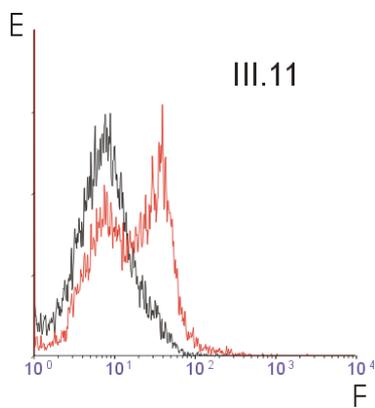


3.1.13 Aptamer III. 11

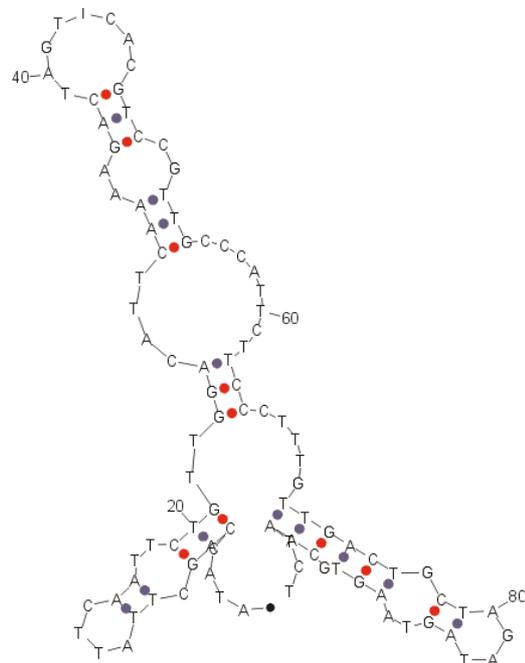
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CTG TTG GAC ATT CAA AAG
 ACT AGT TCA CGT CCG TTG CCC ATT CTT CCC TTT GTT GAC TGC T AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

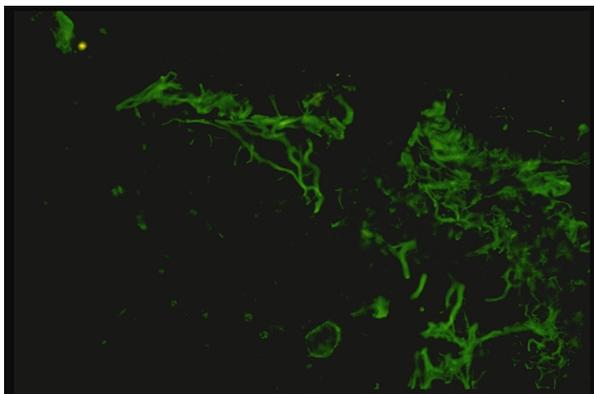
b) FACS-Histogramm



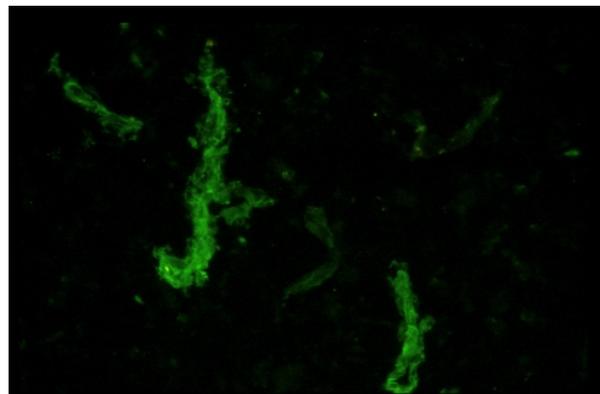
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

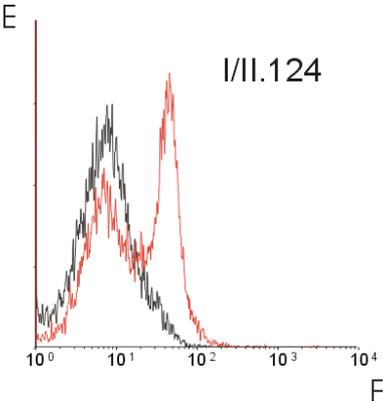


3.1.14 Aptamer I/II. 124

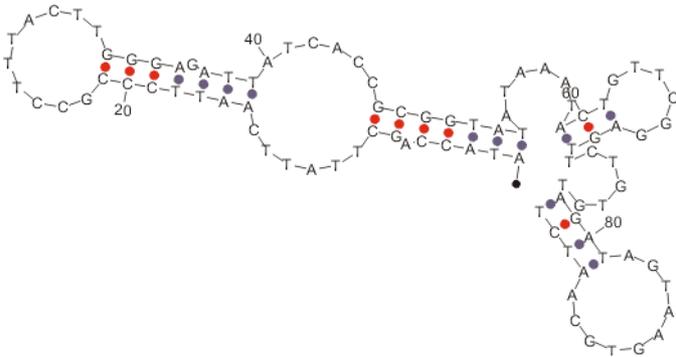
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCC GCC TTT ACT TGG GAG
ATT ATC ACC GCG GTA TAT AAA TAC TGT TCG GAG TTC TGT GT AGA TAG
TAA GTG CAA TCT - 3'

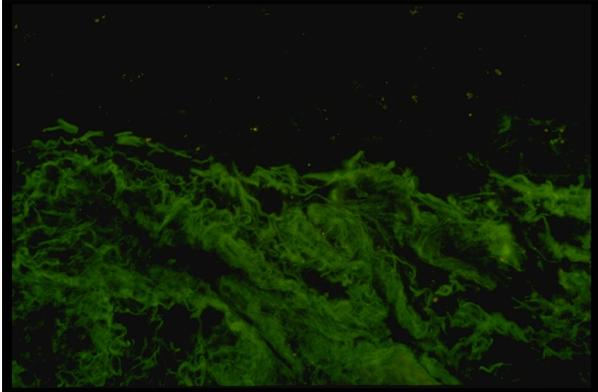
b) FACS-Histogramm



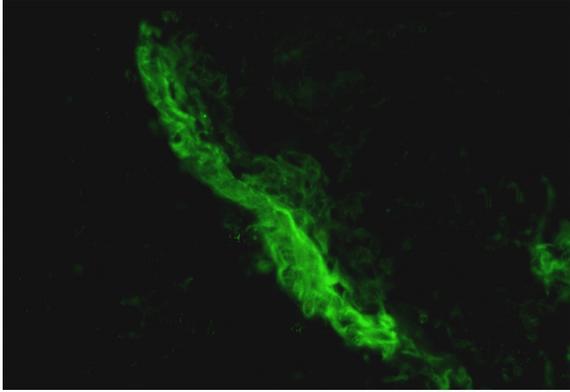
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

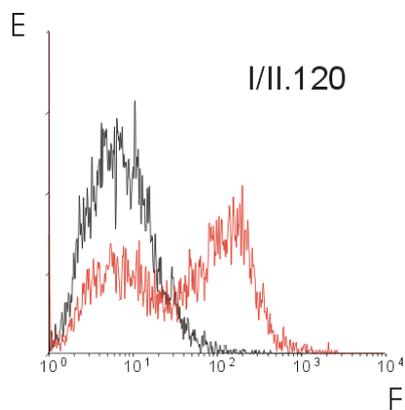


3.1.15 Aptamer I/II. 120

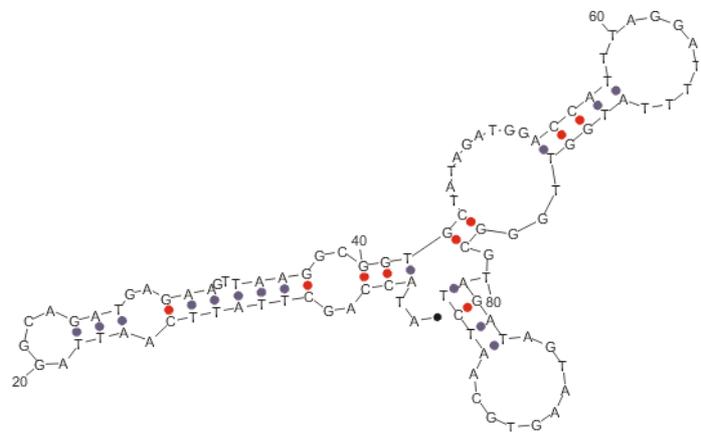
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGG CAG ATG AGA AGT TAA
 GGC GGT GCT ATA GAT GGA CCA TTT AGG ATT TTA TGG TTG GGC GT AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

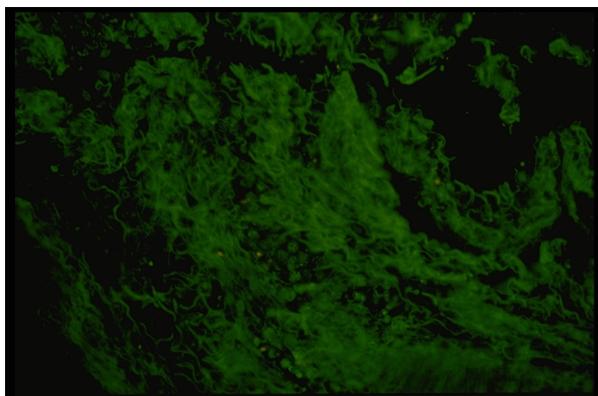
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

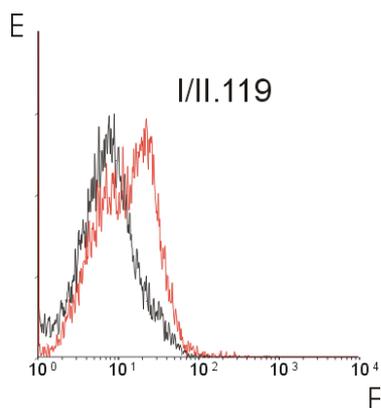
keine Strukturen erkannt

3.1.16 Aptamer I/II. 119

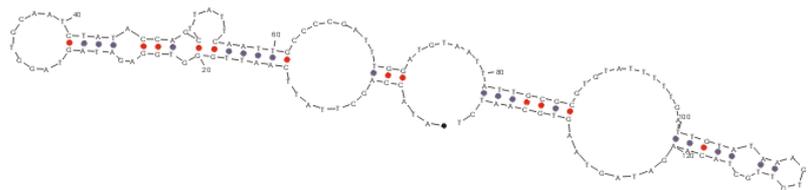
a) Sequenz:

```
5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGG TGG AGA TAG TAG GTG
CAA TCT ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCC CCG ATT TGG ATG TAA TTA
TTG CGC GTG TAT TTT TGA TTG TAT AAA GTG TTG CTA CA AGA TAG TAA
GTG CAA TCT - 3'
```

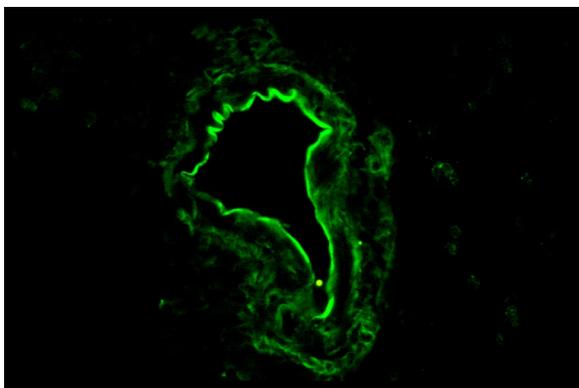
b) FACS-Histogramm



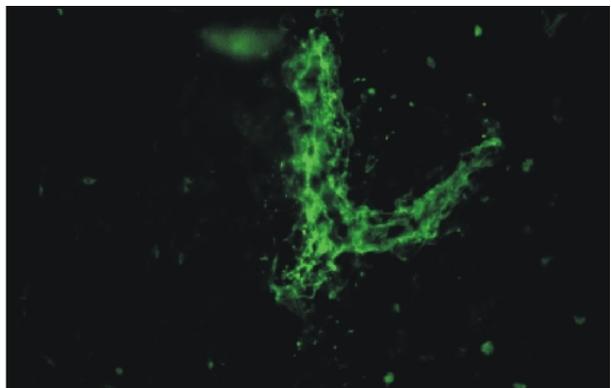
c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

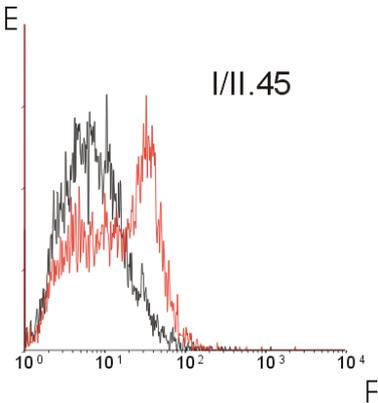


3.1.17 Aptamer I/II. 45

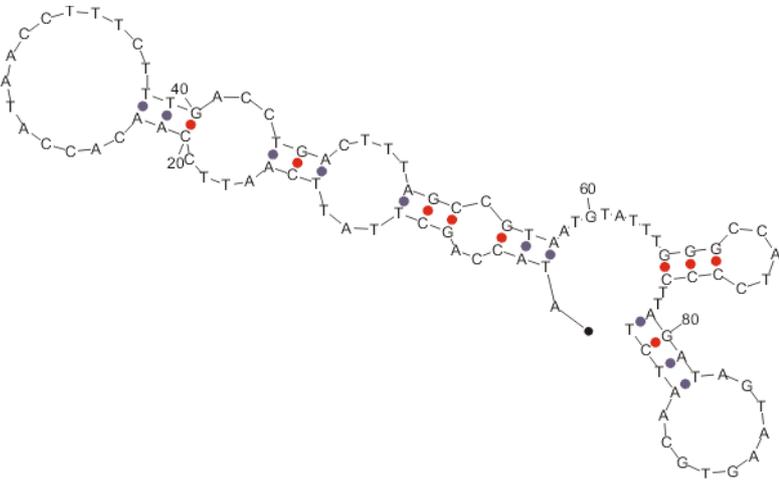
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCA ACA CCA TAA CCT TTC
 TTT GAC CTG ACT TTA GCC GTA ATG TAT TTG GGC CAT CCC CTT AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

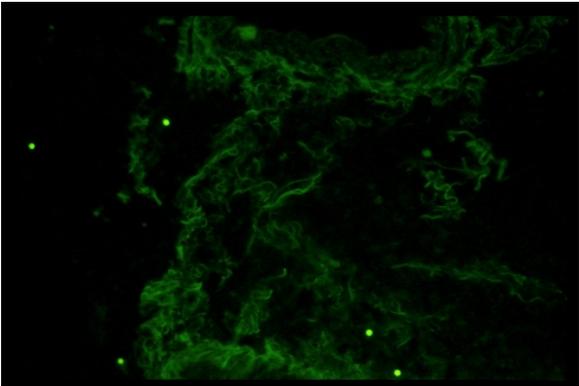
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

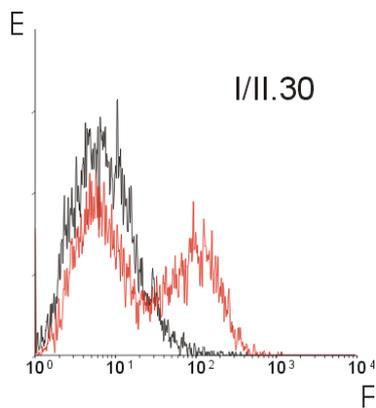
keine Strukturen erkannt

3.1.18 Aptamer I/II. 30

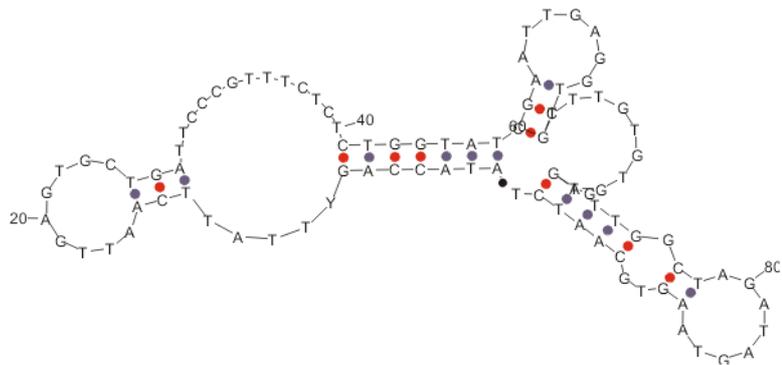
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GYT TAT TCA ATT GAG TGC TGA TTC CCG TTT
 CTC TCT GGT ATC GAA TTG AGG TCG TTT GTG TGT GAG TTG GCT AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

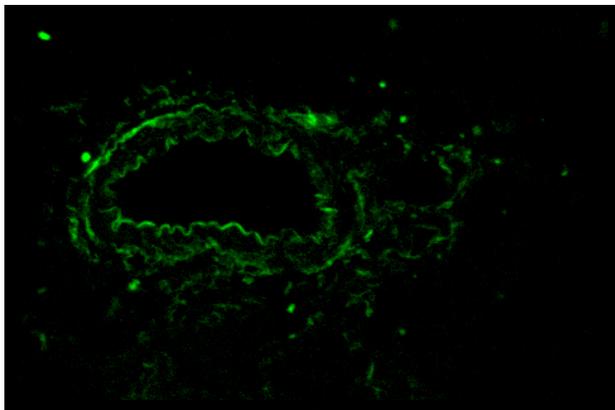
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

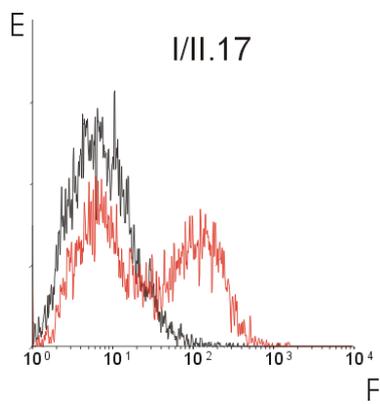
keine Strukturen erkannt

3.1.19 Aptamer I/II. 17

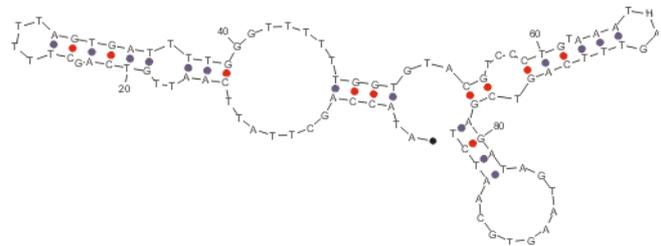
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GTC AGC TTT TTA GTG ATT
 TTG GGT TTT TTG GTG TAC GTC CCT GTA AAT HAG TTT CAG TCG AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

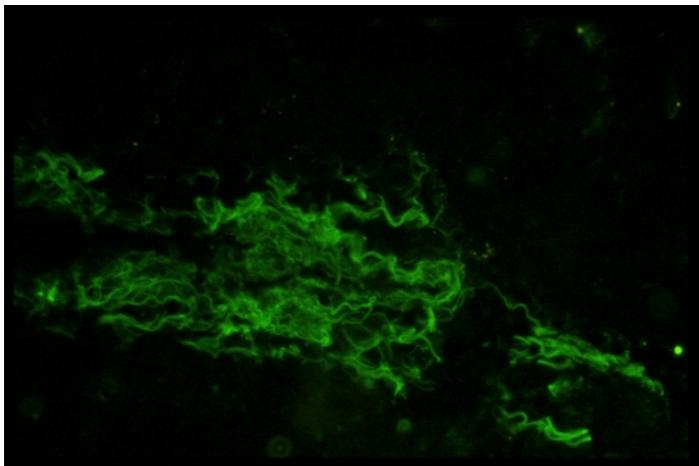
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

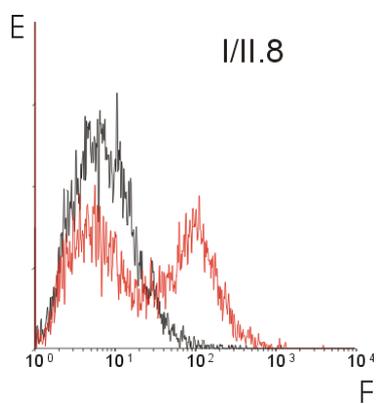
keine Strukturen erkannt

3.1.20 Aptamer I/II. 8

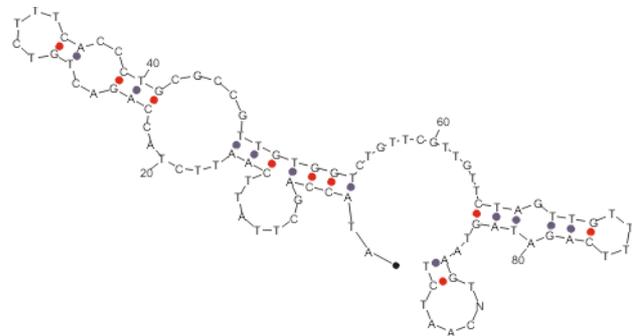
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CTA CCA GAC TGT CTT TCA
 CCC TGC GCC GTT GTG GTC TGT TCG TTG TTC TAG TTG TTT TC AGA
 TAG TAA GTN CAA TCT - 3'

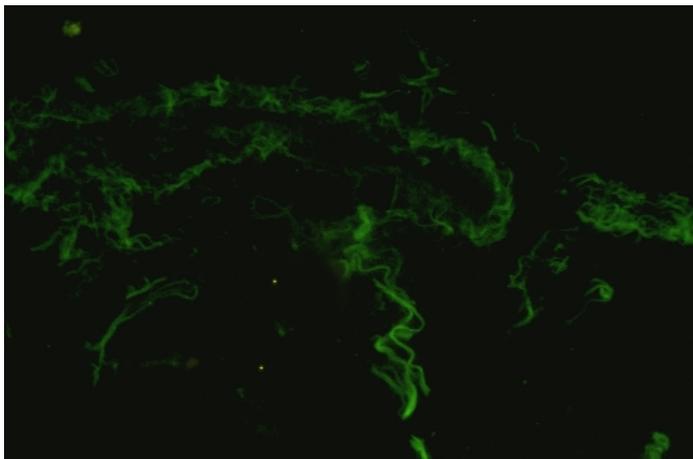
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom



e) EAE

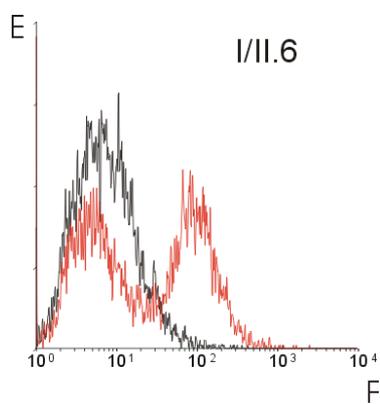
keine Strukturen erkannt

3.1.21 Aptamer I/II. 6

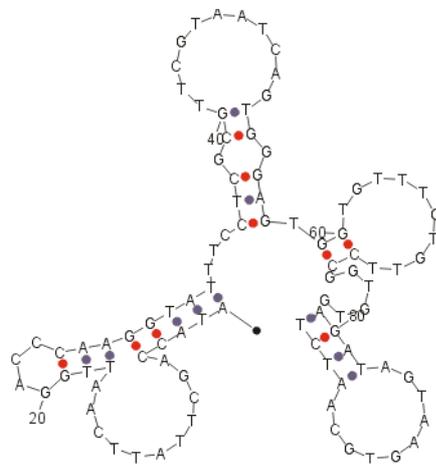
a) Sequenz:

5' - FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGA CCC AAG GTA TTT CCT
 CGC GTT CGT AAT CAG TGG GAG TGG TGT TTG TGT TCC GGT GTG AGA
 TAG TAA GTG CAA TCT - 3'

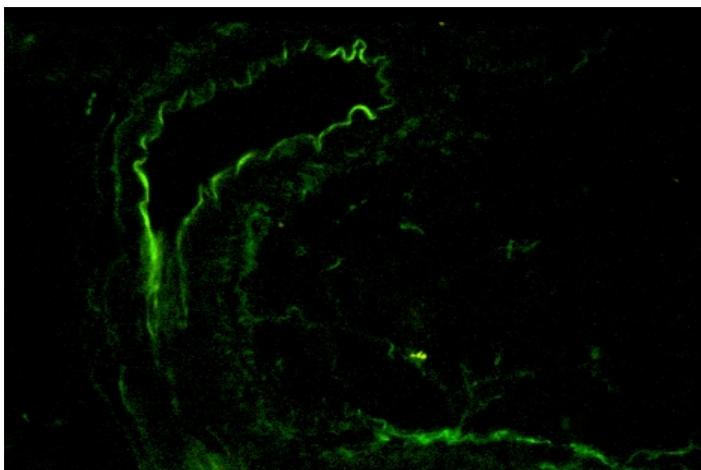
b) FACS-Histogramm



c) Sekundärstrukturvorschlag



d) C6-Glioblastom

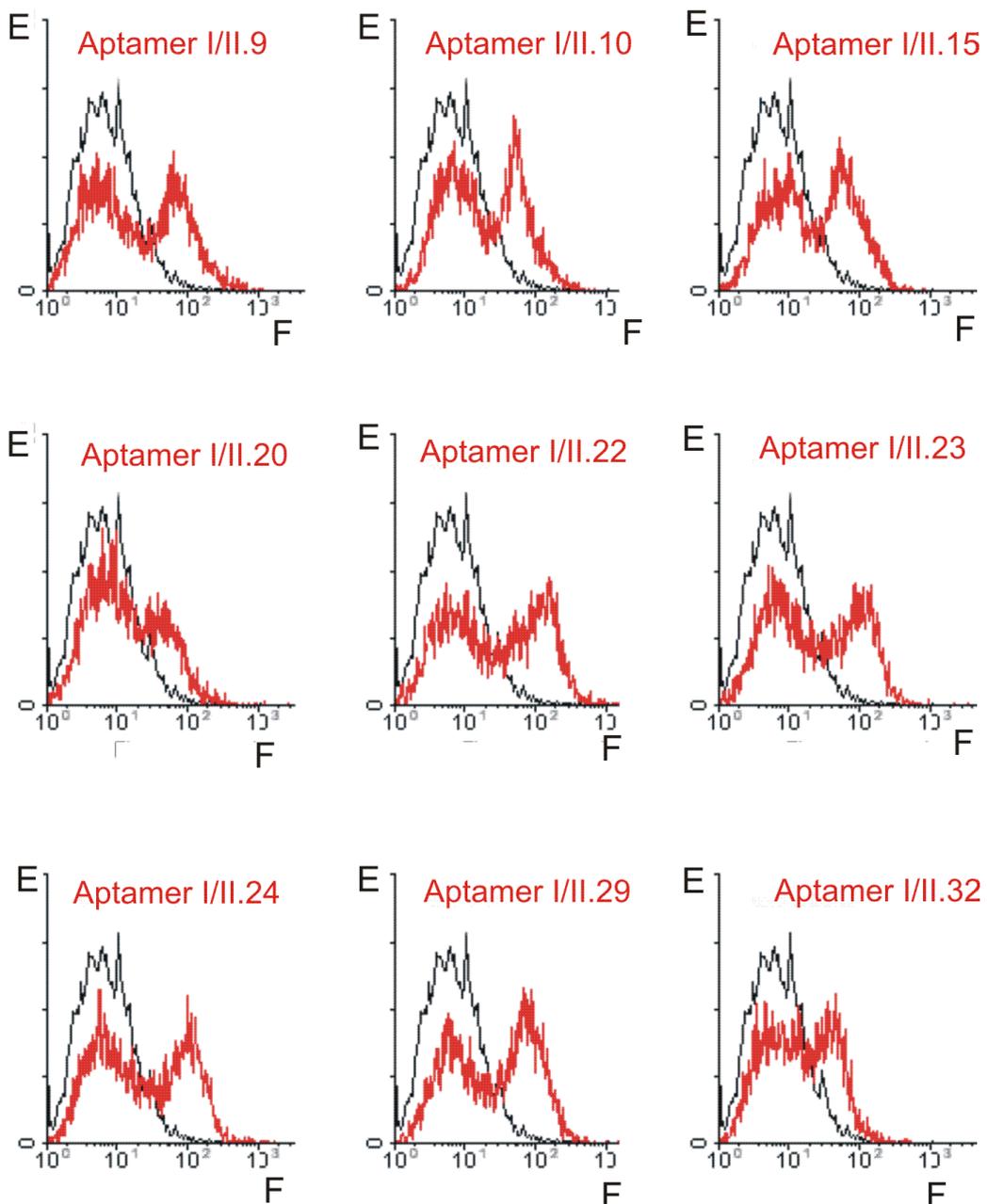


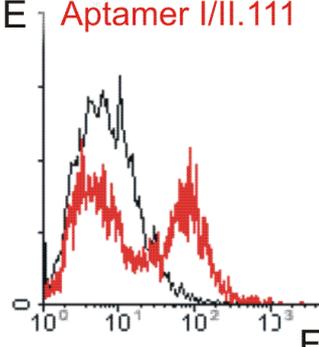
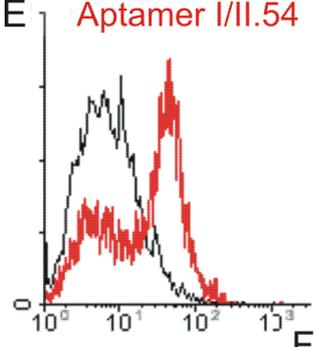
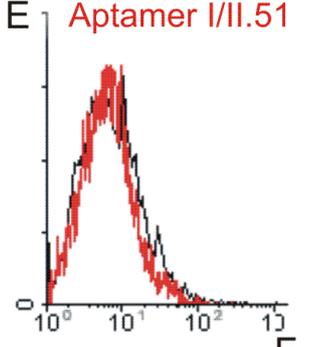
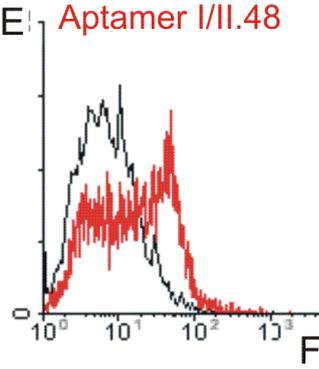
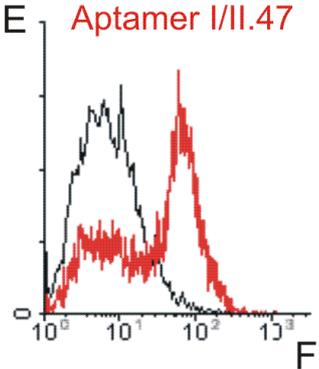
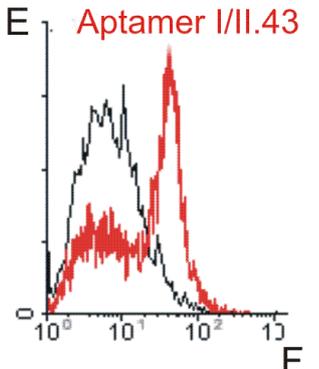
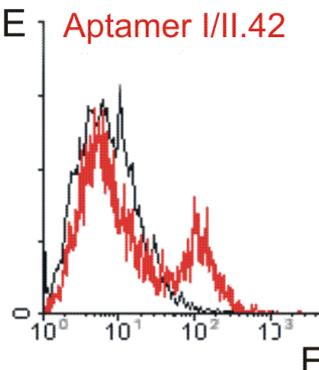
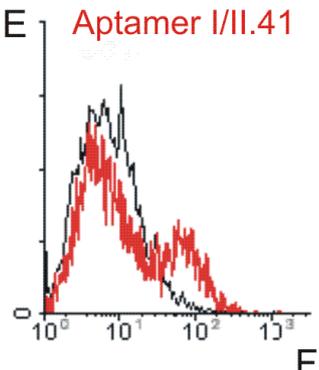
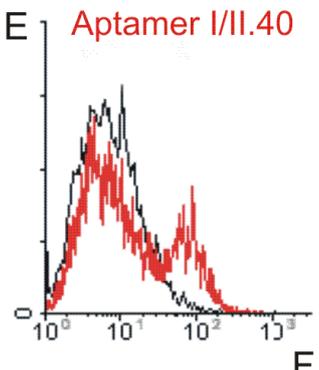
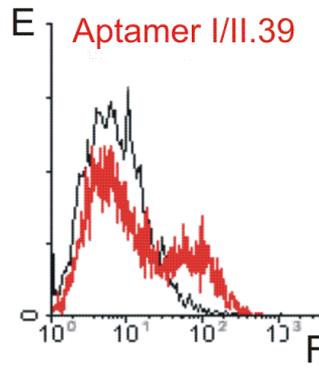
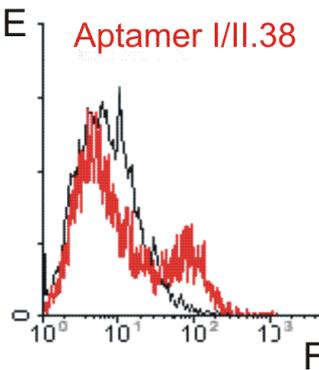
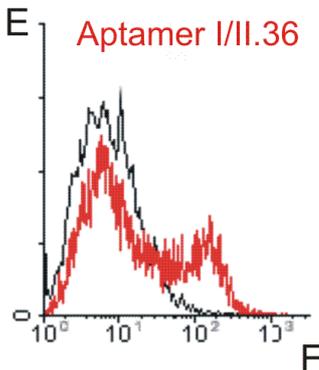
e) EAE

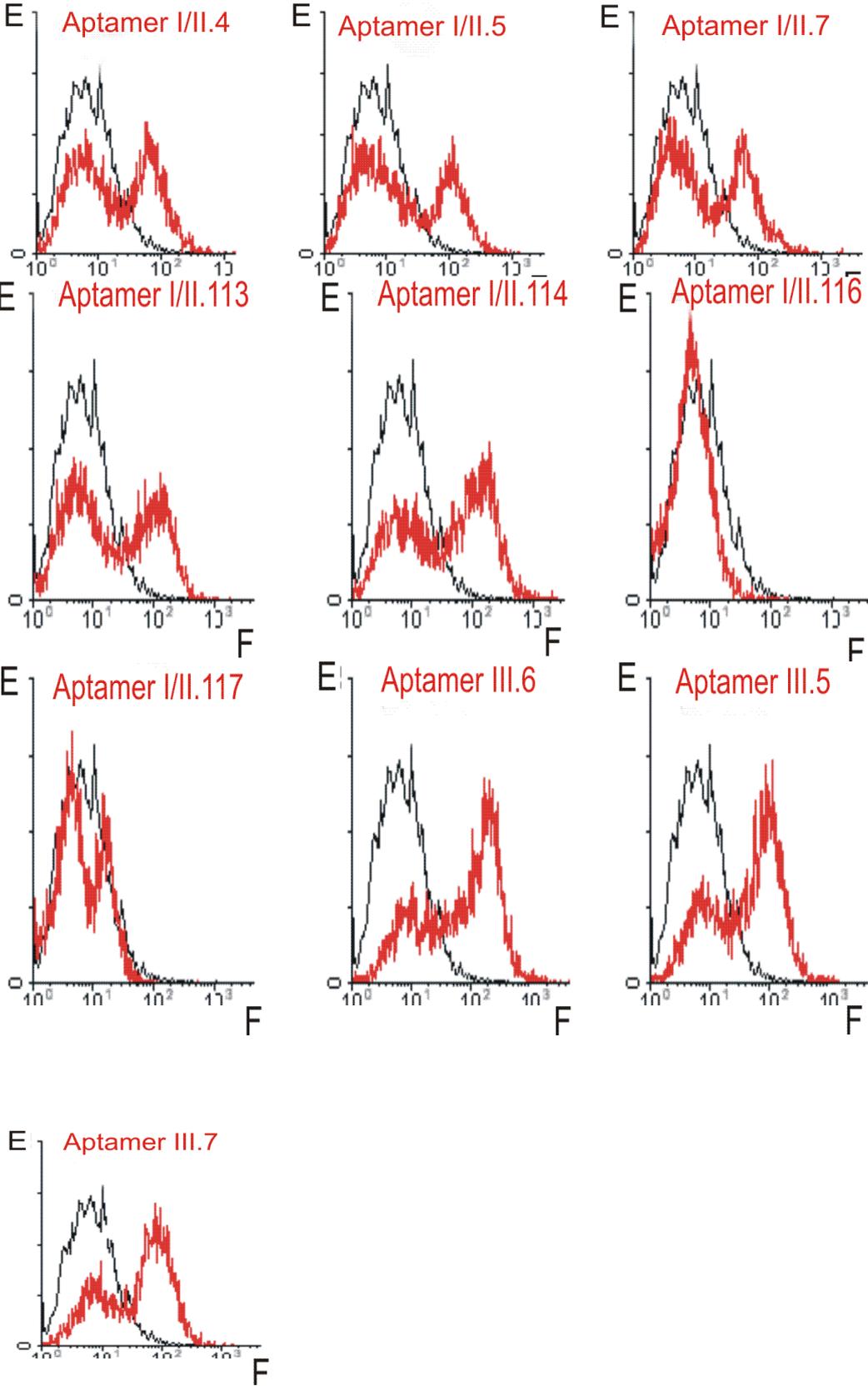
keine Strukturen erkannt

3.2 Unspezifische Aptamere

31 weitere gemäß der allgemeiner Arbeitsvorschrift 1.10 und 1.11 getesteten Aptamere konnten nicht eindeutig zwischen der aktivierten Vaskulatur des pathologischen Rattenhirns und der gesunden Vaskulatur des Normalhirns unterscheiden. Sie erkannten entweder überhaupt keine endothelialen Zielstrukturen auf Gewebeschnitten oder färbten neben Endothelzellen auch andere Zelltypen. Verglichen mit unselektierter FITC-18C-markierter ssDNA (schwarze Kurven) zeigten durchflusszytometrische Untersuchungen von FITC-18C-markierten Aptameren gemäß der Vorschrift 1.10 (rote Kurven) – mit Ausnahme der Aptamer I/II.51, I/II.116 und I/II.117 – jedoch erhöhte Endothelzell-Affinität. Ihre FACS-Histogramme sind im Folgenden abgebildet [X-Achse: FITC-Fluoreszenzintensität (F); Y-Achse: Ereignisse(E)].







Literaturverzeichnis

- (1) Robert, A., Eward, D.V.M. Neuwelt, M.D. *Neurosurgery* **42**, 1083-1100 (1998).
- (2) Staddon, J.M., Rubin, L.L. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 622-627 (1996).
- (3) Plate, K.H. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **4**, 313-320 (1999).
- (4) Kalaria, R.N. *Am. J. Pathol.* **154**, 1311-1314 (1999).
- (5) Lampson, L. A., Wen P., Roman V. A., Morri J. H. and Sarid J. A. *Cancer Res.* **52**, 1018–1025 (1992).
- (6) Bradley, E.T., Vanderlugt, C.L., Eagar, T.N. *J. Clin. Invest.* **107**, 995-1006 (2001).
- (7) Pardoll, D.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5340-5342 (1999).
- (8) Neuwelt, E.A., Kroll, R.A. *Methods in Neuroscience* **21**, 52-58 (1994).
- (9) Rak, J.W., Croix, B.D. Kerbel, R.S. *Anti-Cancer Drugs* **6**, 3-18 (1995)
- (10) Schlegel, U., Wesphal, M. *Neuroonkologie*, Georg Thieme Verlag, New York, 1998.
- (11) Lee, S.J., Benveniste, E.N. *J. Neuroimmunol.* **98**, 77-88 (1999).
- (12) De Broe, S., Christopher, F., Waugh, N. *Health Technol. Assess.* **5**, 1-47 (2001).
- (13) Jyrki, H. *Int. J. Cancer* **65**, 717-722 (1996).
- (14) Zetter, B.R. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1243-1244 (1997).
- (15) Risau, W. *Nature (London)* **386**, 671-674 (1997).
- (16) Meager, A. *J. Immunol. Methods* **190**, 235-244 (1995).
- (17) Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182-1186 (1971).
- (18) Folkman, J. *Nature Medicine* **1**, 27-31 (1995).
- (19) Brower, V. *Nature Biotechnol.* **17**, 963-968 (1999).
- (20) Kerbel, R.S. *Nature (London)* **390**, 335-336 (1997).
- (21) Thorpe, P.E., Derbyshire, E.J. *J. Contr. Release* **48**, 277-288 (1997).
- (22) Steinmann, L. *Cell* **85**, 299-302 (1996).
- (23) Feghali, C.A., Wright, T.M. *Front. Bioscience.* **2**, 12-26 (1997).
- (24) Merrill, J.E., Beneviste, E.N. *Trends Neurosci* **19**, 331-338 (1996).

-
- (25) Hart, T., Lamont, A., Williams, D. *DDT* **3**, 516-521 (1998).
- (26) Neri, D., Carnemolla, B., Nissim, A., Leprini, A., Querzè, G., Balza, E., Pini, A., Tarli, L., Halin, C., Neri, P., Zardi, L., Winter, G. *Nature. Biotechnol.* **15**, 1271-1275 (1997).
- (27) Levitan, B. *J. Mol. Biol.* **277**, 893-916 (1998).
- (28) Weber, L. *DDT* **3**, 379-385 (1998).
- (29) Arap, W., Pasqualini, R. Ruoslati, E. *Science*. **279**, 377-380 (1998).
- (30) Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O. P., Heikkilä, P., Kantor, C., Gahmberg, C. G., Salo, T., Kontinen, Y. T., Sorsa, T., Ruoslati, E. and Pasqualini, R. *Nat. Biotechnol.* **17**, 768-774 (1999).
- (31) Livnah, O., Stura, E. A., Johnson, D. L., Middleton, S. A., Mulcahy, L. S., Wrighton, N. C., Dower, W. J., Jolliffe, L. K. and Wilson, I. A. *Science* **273**, 464-471 (1996).
- (32) Gold, L., Polisky B., Uhlenbeck O. and Yarus M. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763-797 (1995).
- (33) Jones, A., Harris, A.L. *Cancer Journal* **4**, 209-217 (1998).
- (34) Wennemers, H. *Comb. Chem. High Throughput Screens* **4**, 273-285 (2001).
- (35) Thorpe, D.S. *Comb. Chem. High Throughput Screens* **3**, 421-436 (2000).
- (36) Sidhu, S.S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 610-616 (2000).
- (37) Tuerk, C., Gold L. *Science* **294**, 505-510 (1990).
- (38) Ellington, A.D., and Szostak, J. *Nature (London)* **346**, 550-553 (1990).
- (39) Nieuwlandt, D., Wecker, M., Gold, L. *Biochemistry*, **34**, 5651-5656 (1995).
- (40) Williams, K.P., Liu, X.-H., Schumacher, T.N.M., Lin, H.Y., Ausiello, D.A., Kim, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11285-11290 (1997).
- (41) Famulok, M. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1698-1702 (1994).
- (42) Majerfeld, I., Yarus, M. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 287-295 (1994).
- (43) Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B. *Science* **263**, 1425-1429 (1994).
- (44) Lato, S.M., Boles, A.R., Ellington, A.D. *Curr. Biol.* **2**, 291-297 (1995).
- (45) Tuerk, C., McDougal, S., Gold, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6988-7004 (1992).

-
- (46) Jellinek, D., Lynot, C.K., Rifkin, D.B., Janjic, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11227-11236 (1993).
- (47) Tsai, D.E., Kenan, D.J., Keene, J.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 8864-8869 (1992).
- (48) Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feistner, B., Jayasena, S.D. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3407-3414 (1996).
- (49) Sassanfar, M., Szostak, J.W. *Nature* **364**, 550-553 (1993).
- (50) Geiger, A., Burgstaller, P., von der Elz, H., Roeder, A., Famulok, M. *Nucleic Acids Res* **24**, 1029-1036 (1996).
- (51) Vant-Hull, B., Payano-Baez, A., Davis, R.H., Gold, L. *J. Mol. Biol.* **278**, 579-597 (1998).
- (52) Eaton, B., Pieken, W. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 837-863 (1994).
- (53) Pieken, W., Olson, D.B., Benseler, F., Aurup, H., Eckstein, F. *Science* **253**, 314-317 (1991).
- (54) Beutel, B., Gold, L. *J.Mol. Biol.* **228**, 803-807 (1992).
- (55) Fitzwater, T., Polisky, B. *Methods Enzymol.* **267**, 275-301 (1996).
- (56) Davis, J.P., Janijic, N., Javornik, B.E., Zichi, D.A. *Methods Immunol.* **267**, 302-314 (1996).
- (57) Tuerk, C., Eddy, S., Parma, D., Gold, L. *J. Mol. Biol.* **213**, 749-761 (1990).
- (58) Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C., Lynott, C.K., Gill, N., Vargese, C. *Biochemistry* **34**, 11363-11372 (1995).
- (59) Jenison, R.D., Jennings, S.D., Walker, D.W., Bargatze, R.F., Parma D. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **8**, 265-279 (1998).
- (60) Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H., Toole, J. *Nature (London)* **355**, 564-566 (1992).
- (61) Symensma, T.L., Giver, L., Zapp, M., Takle, G.B., Ellington, A.D. *J. Virol.* **70**, 179-187 (1996).
- (62) Good, P.D., Kirkos, A.J., Li, S.X.L, Bertrand, E., Giver, N.S., Ellington, A.D., Zaia, J.A., Rossi, J.J., Engelke D.R. *Gene Therapy* **4**, 45-54 (1996).

-
- (63) Jellinek, D., Green, L.S., Janjic, N. *Biochemistry* **33**, 10450-10456 (1994).
- (64) Ostendorf, T., Kunter, U., Eitner, F., Loos, A., Regele, H., Kerjaschki, D., Henninger, D.D., Janjic, N., Floege, J. *J. Clin. Invest.* **104**, 913-923 (1999).
- (65) Osborne, S.E., Matsumura, I., Ellington, A.D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 5-9 (1997).
- (66) Jayasena, S.S. Aptamers: An Emerging Class of Molecules that rival Antibodies in Diagnostics *Clin.Chem.* **45**, 1628-1650 (1999).
- (67) Kohler, G., Milstein, C. *Nature (London)* **256**, 496-497 (1975).
- (68) Drolet, D.W., Moon-McDermott, L., Roming, V. *Nature. Biotechnol.* **14**, 1021-1025 (1996).
- (69) Cook, D.B., Self, C.H. *Monoclonal Antibodies in diagnostic immunoassays*. Ritter, M.A. Ladyman, H.M. eds. *Monoclonal antibodies, Cambridge University Press*, Cambridge, UK. 180-208 (1995).
- (70) Boulianne, G.L., Hozumi, N., Shulman, M.J. *Nature (London)* **312**, 643-646 (1984).
- (71) Vaughan, T., Osborne, J.K., Tempest, P.R. *Nature. Biotechnol.* **16**, 535-539 (1998).
- (72) Viti, F., Tarli L., Giovannoni L., Zardi L., Neri D. *Cancer Res.* **59**, 347-352 (1999).
- (73) Birchler, B., Viti, F., Zardi, L., Spiess, B. and Neri, D. *Nature. Biotechnol.* **17**, 984-988 (1999).
- (74) He, M., Taussig, M.J. *Nucleic Acids Res.* **25**, 5132-5134 (1997).
- (75) Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R., Pluckthun, A. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **95**, 14130-15235 (1998).
- (76) Roberts, R.W., Szostak, S.W. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **94**, 12297-12302 (1997).
- (77) Kirkham, P.M., Neri, D., Winter, G. *J. Mol. Biol.* **285**, 909-915 (1999)
- (78) Van Ness, J., Laemmli, U.K., Pettijhon, D.E. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **81**, 7897-7901 (1984).
- (79) Livnah, O., Stura, E.A., Zardi, L., Spiess, B., Neri, D. *Nature. Biotechnol.* **17**, 984-988 (1999).
- (80) Kawazoe, N., Ito, Y., Imanishi Y. *Anal. Chem.* **68**, 4309-4311 (1996).
- (81) Osborne, S.E., Völker, J., Stevens, S.Y., Breslauer, K.J., Glick, G.D. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11993-12003 (1996).

-
- (82) Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M., Janjic N. *Chem. Biol.* **2**, 683-695 (1995).
- (83) Gold, L. *J. Biol. Chem.* **270**, 13581-13584 (1995).
- (84) Davis, K. A., Lin, Y., Abrams, B., and Jayasena, S. D. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3915–3924 (1998).
- (85) Davis, K.A., Abrams, B., Lin, Y., Jayasena, S.D. *Nucleic Acids Res.* **24**, 702-706 (1996).
- (86) Potyrailo, R., Conrad, R.C., Ellington, A.D., Hieftje, G.M. *Anal. Chem.* **70**, 3419-3425 (1998).
- (87) Morgan, C.L., Newman, D.J., Price, C.P. *Clin. Chem.* **42**, 193-209 (1996).
- (88) Kleinjung, F., Klussmann, S., Erdmann, V.A., Scheller, F.W., Furste, J.P., Bier, F.F. *Anal. Chem.* **70**, 328-331 (1998).
- (89) Brody, E.N., Gold, L. *J. Biotechnol.* **74**, 5-13 (2000).
- (90) Zipkin, I. *BioCentury* **6**, 1-4 (1998).
- (91) Maskos, U., Southern, E.M. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1679-1684 (1992).
- (92) Fodor, S.P.A., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Solas, D. *Science* **251**, 767-773 (1991.)
- (93) Brody, E.N., Willis, M.C., Smith, J.D., Jayasena, S., Zichi, D., Gold, L. *Mol. Diagnosis* **4**, 381-388 (1999).
- (94) Rudolph, A.S., Reasor J. *Biosens Bioelectron* **16**, 429-31 (2001).
- (95) NeXstar Pharmaceuticals (Boulder); Blind, M., Nascacell (München), Kleinjung, S., Noxxon (Berlin), Ellington, A.D. (Univ. Austin Texas) persönliche Mitteilungen.
- (96) Morris, K.N., Jensen, K.B., Julin, C.M., Weils, M., Gold, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2902-2907 (1998).
- (97) Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E.E., Gibson, T., Boni, I., Gold, L. *Biochemistry* **34**, 3640-3648 (1995).
- (98) Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Willis, J. W., Golovine, S., Wang, J.-F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11509-11513 (1995).
- (99) Homann, M., Göringer, H.U. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2006-2014 (1999).

-
- (100) Deininger, M., Schlüsener, H.J. *J. Neuroimmunol.* **95**, 202-208 (1999).
- (101) Yamazaki, K., Lehr J. E., Rhim J. S. and Pienta K. J. *In Vivo* **9**, 421-426 (1995).
- (102) Engelmann, K., Bednarz, J., Bohnke, M. *Ophthalmologe* **96**, 555-62 (1999).
- (103) Osborne, S.E., Matsumura, I., Ellington, A.D. *Curr. Biol.* **1**, 5-9 (1997).
- (104) Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C., Lynott, C.K., Gill, N., Vargeese, C., Kirschenheuter, G., McGee, D.P.C. Abeshinge, P., Pieken, W.A. *Biochemistry* **34**, 11363-11372 (1995).
- (105) Casey B.P., Glazer P.M. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 163-92 (2001).
- (106) Conrad, R., Ellington, A.D. *Anal. Biochem.* **242**, 261-265 (1996).
- (107) Tamm I., Dorken B., Hartmann G. *Lancet* **11**, 489-97 (2001).
- (108) Vlassow, V.V., Vlassova, I.E., Pautova, L. *Prog. in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **57**, 95-143 (1997).
- (109) Pagratis, N.C., Bell, C., Chang, Y-F., Jennings, S., Fitzwater, T. Jellinek, D., Dang, C. *Nature Biotechnol.* **15**, 68-73 (1996).
- (110) Haller, A.A., Sarnow, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8521-8526 (1997).
- (111) Ferrari, D. *J. Immunol.* **156**, 1531-1539 (1996)
- (112) Singh D., Kumar V., Ganesh K.N. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3339-3345 (1990).
- (113) German, I., Buchanan, D.D., Kennedy, R.T. *Anal. Chem.* **70**, 4540-4545 (1998).
- (114) Steinman, L. *Cell* **85**, 299-302 (1996).
- (115) Schlüsener, H.J., Seid, K., Zhao, Y., Meyermann, R. *Glia*, **20**, 365-372 (1997).
- (116) Zamvil, S.S., Steinmann, L. *Annu. Rev. Biochem.* **8**, 579 (1990).
- (117) Blind, M., Kolanus, W., Famulok, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3606-3610 (1999).
- (118) Brouwer, J., van der Goes, A., Hoekstra, K., Roos, D., van der Berg, T.K., Dijkstra, C.D. *J. Neuroimmunol.* **92**, 67-75 (1998).
- (119) Ruuls, S.R., Bauer, J., Sontrop, K., Huitinga, I., 't Hart, B.A., Dijkstra, C.D. *J. Neuroimmunol.* **56**, 207-217 (1995).
- (120) Offen, D., Kaye, J.F., Bernard, O., Merims, D., Coire, C.I., Panet, H., Melamed, E., Ben-Nun, A. *J. Mol. Neurosci.* **15**, 167-176 (2000).

-
- (121) Cho, M., Hunt, T.K., Hussain, M.Z. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280**, 2357-2363 (2001).
- (122) Kayanoki, Y., Higashiyama, S., Suzuki, K., Asahi, M., Kawata, S., Matsuzawa, Y., Taniguchi, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 50-55 (1999).
- (123) Barchowsky, A., Klei, L.R., Dudek, E.J., Swartz, H.M., James, P.E.. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1405-1412 (1999).
- (124) Valen, G., Erl, W., Eriksson, P., Wuttge, D., Paulsson, G., Hansson, G.K. *Free Radic. Res.* **31**, 503-12 (1999).
- (125) Hanna, N.N., Seetharam, S., Mauceri, H.J., Beckett, M.A., Jaskowiak, N.T., Salloum, R.M., Hari, D., Dhanabal, M., Ramchandran, R., Kalluri, R., Sukhatme, V.P., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R. *Cancer J.* **6**, 287-93 (2000).
- (126) Care, A., Felicetti, F., Meccia, E., Bottero, L., Parenza, M., Stoppacciaro, A., Peschle, C., Colombo, M.P. *Cancer Res.* **61**, 6532-6539 (2001).
- (127) Albonico, G., Pellegrino, G., Maisano, M., Africa, G., Pedriali, M., Nenci, I. *Pathologica* **93**, 136-138 (2001).
- (128) Senoo, T., Joyce, N.C. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 660-667 (2000).
- (129) Tran, P.O., Tran, Q.H., Hinman, L.E., Sammak, P.J. *Cell Prolif.* **31**, 155-170 (1998).
- (130) Sammak, P.J., Hinman, L.E., Tran, P.O., Sjaastad, M.D., Machen, T.E.. *J Cell Sci.* **110**, 465-475 (1997).
- (131) Burger, P.C. *Appl. Neurophysiol.* **46**, 180-187 (1997).
- (132) Wahlberg, J., Lundberg, J., Hultman, T., Uhlen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6569-6575 (1990).
- (133) Jakobsen, C., Kalland, K.S., Haukanes, B.I., Havarstein, L.S., Kleppe, K. *Anal. Biochem.* **189**, 40-42 (1990).
- (134) Lea, T., Vardtal, F., Nustad, K. *J. Mol. Recog.* **1**, 9-15 (1988).
- (135) Gabrielsen, O. S., Huet, J. *Methods in Enzymol.* **218**, 508-525 (1993).
- (136) Klocker, N., Kermer, P., Gleichmann, M., Weller, M. and Bahr, M. *J. Neurosci.* **19**, 8517-8527 (1999).
- (137) Weinschenk, T. Abteilung für Massenspektrometrie des Instituts für Zellbiologie der Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

-
- (138) Alliegro, M.C., Alliegro, M.A. *Develop. Biol.* **174**, 288-297 (1996).
- (139) Alliegro, M.C. *Exp. Cell Res.* **255**, 270-277 (2000).
- (140) Alliegro, M.C., Alliegro, M.A. *Exp. Cell Res.* **227**, 386-390 (1996).
- (141) Alliegro, M.C., Alliegro, M.A. *Exp. Cell Res.* **239**, 60-68 (1998).
- (142) Groothuis, D.R., *Neuro-Oncol.* **2**, 45-59 (2000).
- (143) Stuerzebecher, S., Martin, R. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **10**, 649- 668 (2000).
- (144) Pasqualini, R., Koivunen, E., Ruoslahti, E. *Nature Biotechnol.* **15**, 542-546 (1997).
- (145) Yuki, Y., Byun, Y., Fujita, M., Izutani, W., Suzuki, T. *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 62-69 (2001).
- (146) Wiegand, T.W., Williams, P.B., Dreskin, S.C., Jouvin, M.-H., Kinet J.-P., Tasset, D. *J. Immunol.* **157**, 231-238 (1996).
- (147) Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- (148) Crameri, A., Stemmer W.P.C. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4410 (1993).
- (149) Anleitung TA Cloning Mini-Kit der Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande (1999).
- (150) Perkins, D.N., Creasy D.M., Cottrell, J.S. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567 . (1999).
- (151) Labor für DNA-Analytik, Dr. Juliane Alt-Mörbe, Wippertstr. 2, 79100 Freiburg.
- (152) Michael-Zuckers DNA-Mfold server: <http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/dna/form1.cgi> (1996-2001).

Dank

Allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei herzlich gedankt. An dieser Stelle danke ich ganz besonders

- meiner Frau Mirjam Karasek und meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion
- Prof. H. Schlüsener und Prof. H. Schott für die freundliche Betreuung, wissenschaftliche Beratung und Förderung dieser Arbeit
- Jutta Bachmann und Prof. Rammensee – der organisatorischen Leitung des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“ – für die Ermöglichung zahlreicher Fortbildungen
- Katrin Trautmann, Karin Seid und Sabine Konrad für die technische Assistenz
- Toni Weinschenk und Martin Priemer für die massenspektrometrischen Analysen
- Mirjam Karasek, Martin Deininger und Tim Füller für das Korrekturlesen dieser Arbeit
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Wilhelm-Sander-Stiftung für die finanzielle Förderung dieser Arbeit
- Prof. R. Meyermann, Frau F. Fridrich und I. Nagel für die stets unbürokratische Hilfe mit verwaltungstechnischen Angelegenheiten
- sämtlichen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung für die schöne Zeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre

Akademische Lehrer

(in alphabetischer Reihenfolge)

Prof. Dr. Dr. h.c. Adam, Prof. Dr. B. Beslin, Prof. Dr. G. Bringmann, Prof. Dr. M. Christl,
Prof. Dr. G. Drews, Prof. Dr. Engel, Prof. Dr. B. Epe, Prof. Dr. F. Grotemeyer, Prof. Dr. H.J.
Gross, Prof. A. Haase, Prof. Dr. Dr. h.c. Hünig, Prof. Dr. W. Kiefer, Prof. Dr. W. Malisch,
Prof. Dr. M. Manz, Prof. Dr. H. Quast, Prof. Dr. U. Scheer, Prof. Dr. W. Schenk, Prof. Dr. Dr.
h.c. Schmidt, Prof. Dr. F.W. Schneider, Prof. Dr. H. Schott, Prof. Dr. H. Schlüsener, Prof. Dr.
D. Stalke, Prof. Dr. H. Wieber, Prof. Dr. H. Werner

Lebenslauf

Michael Blank

geb. 03.03.1970 in Ellwangen/Jagst

SCHULAUSBILDUNG

- | | |
|----------------|--|
| 1980 – 1989 | Hariolf-Gymnasium
<i>Ellwangen/Jagst</i> |
| 24. April 1989 | Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
mit den Hauptfächern Biologie und Mathematik |

WEHRERSATZDIENST

- | | |
|----------------------|--|
| Juni 1989 Sept. 1990 | Schwerstbehindertenbetreuung
<i>Gerabronn</i> |
|----------------------|--|

HOCHSCHULAUSBILDUNG

- | | |
|------------------|--|
| November 1990 | Beginn des Studiums Chemie (Diplom)
<i>Julius-Maximilian-Universität Würzburg</i> |
| Oktober 1993 | Vordiplom in den Fächern: Physik, Organische Chemie,
Anorganische Chemie, Physikalische Chemie |
| Februar 1996 | Diplom-Prüfung in den Fächern Organische Chemie,
Anorganische Chemie, Physikalische Chemie |
| März – Dez. 1996 | Diplomarbeit im Fach Organische Chemie
„Hochhalogenierte Tetrahydro- β -Carboline als Inhibitoren der
mitochondrialen Atmungskette: Struktur-Wirksamkeits-
Untersuchungen“, <i>Julius-Maximilian-Universität Würzburg,</i>
<i>Lehrstuhl Prof. Dr. G. Bringmann</i> |
| 30. Dez. 1996 | Verleihung des akademischen Grades Diplom-Chemiker (univ.) |

- April 1997 – Juni 1998 Promotionsstudium im Fach Organische Chemie
„Untersuchung von DNA-Schäden induziert durch das Neurotoxin TaClo bzw. davon abgeleiteter Derivate“ (abgebrochen), *Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Lehrstuhl Prof. Dr. G. Bringmann*
- Juli 1998 – Okt. 1998 Qualifikation für eine molekularbiologisch ausgerichtete Promotion: Einarbeitung in molekularbiologische Techniken und Vorarbeiten zur Aufnahme in ein Graduiertenkolleg, *Institut für Hirnforschung, Eberhard-Karls-Universität Tübingen*
- Okt. 1998 – Nov. 2001 Promotionsstudium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“: „Systematische Evolution von DNA-Aptameren zur Charakterisierung und Diagnostik von pathologisch veränderten Endothelzellen in Tumoren und entzündlichen Regionen des Rattenhirns“ *Institut für Hirnforschung, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Lehrstuhl Prof. Dr. H. Schlüsener*
- seit Februar 2002 Angestellt als Wissenschaftler bei *NascaCell GmbH, Tutzing*

Teile der vorliegenden Arbeit sind Bestandteil folgender Veröffentlichungen, wissenschaftlichen Präsentationen und Auszeichnungen:

ORIGINAL PUBLIKATIONEN

- K. Peters, E.-M. Peters, M. Blank, J.-A. Protzen, D. Feineis, R. God, G. Bringmann (1R,3S)-1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide Methanol Solvate, a Potential Synthetic Precursor to Enantiomerically Pure TaClo *Acta Cryst.* 1998, **C54**, 1005-1007. [▲]
- Internationale Patentanmeldung: M. Blank, H. Schlüsener, Zellbindende Nukleinsäuremoleküle (Aptamere) (angemeldet April 2000).
- G. Bringmann, D. Feineis, R. God, R. Brückner, J.-A. Protzen, M. Blank, K. Peters, E.-M. Peters, B. Janetzky, H. Reichmann, Chemical Modification of the Mitochondrial Complex I Inhibitor 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline: Synthesis and Evaluation of N-Alkanoyl Derivatives *Z. Naturforsch.* 2000, **55c**, 620-630. [▲]
- G. Bringmann, D. Feineis, R. Brückner, M. Blank, K. Peters, E.-M. Peters, H. Reichmann, B. Janetzky, C. Grote, H.-W. Clement, W. Wesemann, Bromal-Derived Tetrahydro- β -carbolines as Neurotoxic Agents: Chemistry, Impairment of the Dopamine Metabolism, and Inhibitory Effects on the Mitochondrial Respiration *Bioorg. Med. Chem* 2000, **8**, 1467-1478. [▲]
- M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer, H. Schlüsener, Systematic Evolution of a DNA Aptamer Binding to Rat Brain Tumor Microvessels: Selective Targeting of Endothelial Regulatory Protein Pigpen *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 16464-16468.

BEITRÄGE AUF KONGRESSSEN / SYMPOSIEN

Poster

- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Aus Fluoreszenzdetektion basierende Selektion von zellbindenden DNA-Aptameren, Fortune Begutachtung, Juli 1999, Tübingen.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener Selektion Endothelzell-bindender DNA-Aptamere durch SELEX. DFG Graduiertenkolleg "Zellbiologie in der Medizin" Begutachtung 17. Jan. 2000 Tübingen.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener Systematic Evolution and Exponential Enrichment of DNA Aptamers Binding to Rat Brain Tumor Microvessels Drug Discovery 2000 European Poster Symposium der Firma Pfizer, 20.-22. Sept. 2000, Sandwich Kent, England.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener Selection of Tumor Microvessel Binding DNA Aptamers: Aptamers Have Great Potential as a Versatile Component in Biosensors, Deutsches BioSensor Symposium, 1.-3. April 2001, Tübingen.

mit [▲] gekennzeichnete Arbeiten sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit

- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Systematic Evolution of a DNA Aptamer Binding to Rat Brain Tumor Microvessels: Selective Targeting of Endothelial Regulatory Protein Pigpen 52. Mosbacher Kolloquium "Evolution – in vivo, in vitro and in machina, " 5.–7. April 2001, Mosbach.

Vorträge

- Michael Blank, Hermann Schlüsener, SELEX - Eine Methode zur Identifizierung von hochaffinen Liganden für eine Vielzahl von Zielstrukturen, 1. Wintersymposium des Graduiertenkollegs "Zellbiologie in der Medizin", 22.-25. Feb. 1999, Oberjoch.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Durchflußzytometrische Evaluierung von zellbindenden DNA-Aptameren, Wochenendseminar des Graduiertenkollegs "Zellbiologie in der Medizin", 19.–20. Nov. 1999, Blaubeuren.
- Michael Blank, Die RNA-Welt, 2. Wintersymposium des Graduiertenkollegs "Zellbiologie in der Medizin", 12.-15. März. 2000, Oberjoch.
- Hermann Schlüsener, Michael Blank, Mikroarrays und Proteom: Brückenbildung über SELEX und Aptamere? Dechema Statusseminar "Chiptechnologien: Vom Genom zum Proteom", 22.–23. Jan. 2001, Frankfurt.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Systematic Evolution of a DNA Aptamer Binding to Rat Brain Tumor Microvessels: Selective Targeting of Endothelial Regulatory Protein Pigpen International Colloquium, European Union Funded Research "Aptamers for diagnostic and in vivo imaging", 7. Mai 2001, Neapel, Italien.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Aptamers as Diagnostics: A New Class of Histologic Markers to Characterize Rat Brain Glioblastoma Microvessels, Gastvortrag an der Uni Paris(INSERM Orsay), 16.Juli 2001, Paris, Frankreich.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Aptamers as Diagnostics: A New Class of Histologic Markers to Characterize Rat Brain Glioblastoma Microvessels, Gastvortrag bei der Firma NascaCell, 10. August 2001, München.
- Michael Blank, Hermann Schlüsener, Aptamers as Diagnostics: A New Class of Histologic Markers to Characterize Rat Brain Glioblastoma Microvessels, Gastvortrag bei der Firma Noxxon, 31. August 2001, Berlin.

AUSZEICHNUNGEN

- European Drug Discovery 2000 Award für Nachwuchswissenschaftler, 1. Preis im Fachbereich Biologie, Systematic Evolution and Exponential Enrichment of DNA Aptamers Binding to Rat Brain Tumor Microvessels, 20.-22. Sept. 2000, Firma Pfizer, Sandwich Kent, England.
- Deutsches BioSensor Symposium der Universität Tübingen, 2. Preis (Posterbeitrag) Selection of Tumor Microvessel Binding DNA Aptamers: Aptamers have Great Potential as a Versatile Component in Biosensors, 1.-3. April 2001, Uni Tübingen.

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und außer den angegebenen keine anderen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tübingen, den