

**Selektion von DNA-Aptameren gegen
aktiviertes Protein C, aktivierten Gerinnungsfaktor XI
und Plasmin mittels Kapillarelektrophorese-SELEX**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Fabian Blümke

aus Krefeld

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. biol. hom. Jens Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Nikos Werner

Tag der Mündlichen Prüfung: 28. Juni 2018

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Oldenburg

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
2.	Einleitung.....	10
2.1	Aptamere.....	10
2.2	SELEX.....	11
2.2.1	Kapillarelektrophorese-SELEX.....	13
2.3	Zielproteine.....	16
2.3.1	Aktiviertes Protein C.....	16
2.3.2	Plasmin.....	17
2.3.3	Aktivierter Faktor XI.....	18
2.4	Ziel der Arbeit.....	19
3.	Material.....	21
3.1	Reagenzien.....	21
3.1.1	Verwendete Enzyme.....	21
3.1.2	Randomisierte DNA Bibliothek IHT1 und zugehörige Oligonukleotide.....	21
3.1.3	Sonstige Reagenzien.....	22
3.2	Verwendete Materialien.....	23
3.3	Verwendete Pufferlösungen.....	24
3.4	Verwendete Geräte.....	26
4.	Methoden.....	27
4.1	Umpufferung der verwendeten Enzyme.....	27
4.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	27
4.3	Kapillar Elektrophorese.....	27
4.3.1	Verwendetes Gerät und Kapillaren.....	27
4.3.2	Allgemeine Vorgehensweise zur Vorbereitung der Ansätze zur Bestimmung der Retentionszeiten und zur Aptamer-Selektion.....	28

4.3.3	CE-Bedingungen	28
4.3.4	Bestimmung der Retentionszeiten.....	31
4.3.5	Aptamer-Selektionen.....	31
4.3.5.1	APC als Zielenzym.....	31
4.3.5.2	Faktor Xla als Zielenzym.....	31
4.3.5.3	Plasmin als Zielenzym.....	32
4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-basierte Verfahren.....	32
4.4.1	Konventionelle, exponentielle DNA-Amplifikation.....	33
4.4.2	Asymmetrische PCR	34
4.4.3	Realtime-PCR (qPCR).....	35
4.5	Agarose Gelelektrophorese.....	36
4.6	Isolierung von ssDNA aus asymmetrischen PCR-Ansätzen mittels Capture and Release (CaR).....	37
4.7	Bestimmung der DNA-Konzentrationen.....	38
4.8	Klonierung und Sequenzierung	38
4.8.1	Klonierung von PCR-Produkten	38
4.8.2	Sequenzierung der Klone	41
4.9	Filterbindungsanalysen.....	42
4.9.1	Radioaktive Markierung von ssDNA-Molekülen	42
4.9.2	Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	43
4.9.3	Filterbindungs-Assay.....	44
5.	Ergebnisse	46
5.1	Selektion von DNA-Aptameren gegen APC	46
5.1.1	Aktivitätstests	46
5.1.2	CE-Vorversuche	47
5.1.3	Selektionsbedingungen	49

5.1.4	Selektionsüberprüfung anhand qPCR	49
5.1.5	Amplifikation mittels symmetrischer und asymmetrischer PCR	51
5.1.6	Isolation der Einzelstränge mittels „Capture and Release“	53
5.1.7	Filterbindungsanalysen.....	54
5.1.8	Klonierung/Sequenzierung	57
5.1.9	Weitere Charakterisierung des Aptamers NB-1	59
5.2	Selektion von DNA-Aptameren gegen Plasmin	62
5.2.1	Aktivitätstests	63
5.2.2	CE-Vorbereitungsläufe	66
5.2.3	Aptamer-Selektion und PCR-Amplifikationen	70
5.2.4	Filterbindungsanalysen.....	73
5.3	Selektion von DNA-Aptameren gegen Faktor XIa	74
5.3.1	Aktivitätstests	74
5.3.2	CE-Vorbereitungsläufe	75
5.3.3	Aptamer-Selektion und PCRs.....	78
5.3.4	Filterbindungsanalysen.....	81
6.	Diskussion	83
7.	Zusammenfassung.....	101
8.	Literaturverzeichnis	103

1. Abkürzungsverzeichnis

a	aktiviert
APC	Aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B15	CE Auftrennungspuffer 15 (siehe 3.5.2)
B&W	binding and wash Puffer
Beads/ magnetische Beads	Dynabeads® M-280 Streptavidin
BSA	Bovines Serum Albumin
C _t	Cycle Threshold
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaR	Capture and Release (Einzelstrangtrennungungsverfahren)
CE	Kapillarelektrophorese (engl. Capillary electrophoresis)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EtBr	Ethidiumbromid
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FXIa	Aktivierter Faktor XIa
g	Gramm (10 ⁻³ kg)
HCl	Salzsäure
IHT1	Randomisierte DNA-Library 1
IHT1FW/IHT1REV	Forward / Reverse-Primer für IHT1-Library
IHT1REVCaptB	Biotin-TEGyliertes Capture Molekül
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K _d	Diffusionskonstante
k _{on}	Reaktionsgeschwindigkeit in Richtung Produkt
k _{off}	Reaktionsgeschwindigkeit in Richtung Edukte
kV	Kilovolt
M	mol l ⁻¹

Min	Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OECA	Oligo-nucleotide based enzyme capture-assay
³² P	Radioaktives Phosphorisotop
PAGE	Polyacrylamid gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Protein C, inaktive Vorstufe von APC
PCR	Polymerasen Kettenreaktion
PDA	Photo diode array
psi	Pounds per square inch (1psi = 6.8948 x 10 ³ Pa)
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	ROX Referenzfarbe
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime-Polymerasen Kettenreaktion
s	Sekunde
T4 PNK	T4 Polynukleotid Kinase
<i>Taq</i> Polymerase	HotStarTaq® <i>Plus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trizma™, Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2. Einleitung

2.1 Aptamere

Aptamere sind RNA- oder DNA-Moleküle (Oligonukleotide), die 1990 zum ersten Mal von Ellington und Szostak als solche beschrieben wurden. Der Begriff Aptamer bildet sich hierbei als Wortchimäre aus „aptus“ (lat.: passen) und „meros“ (griech.: Teil) (Ellington und Szostak, 1990; Famulok et al., 2000). Diese Bezeichnung hat folgenden Grund: Durch die Faltung in eine dreidimensionale Tertiärstruktur, die von der jeweiligen Basenfolge des Aptameres abhängt, ist es für Aptamere möglich, an definierte Zielmoleküle, zum Beispiel Proteine zu binden. Wichtige Rollen in der Ausbildung solcher Bindungen spielen im allgemeinen van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen aber auch spezielle Voraussetzungen in der Proteinstruktur, z.B. Guanidiniumgruppen von Argininseitenketten, welche insgesamt zu hochkomplexen Bindungsnetzwerken in den jeweiligen „Bindungstaschen“ der Proteinoberfläche führen. Dies alles endet in einer hochaffinen und hochspezifischen Bindung des Aptameres an sein jeweiliges Zielmolekül (Hermann und Patel, 2000). Durch diese Bindungseigenarten und die vergleichsweise einfache und günstige Herstellung haben sich Aptamere in den letzten Jahren im Vorteil gegenüber monoklonalen Antikörpern erwiesen, besonders da letztere durch die recht kleine Oberflächenbindung vor allem in Sachen Spezifität zurückstehen (Rimmele, 2003).

Als wahrscheinlich bekanntestes Aptamer existiert mit Pegaptanib (PEGylierter Aptamer Inhibitor) eines, welches sich bereits seit 2004 im klinischen Gebrauch befindet und in der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration als Inhibitor von VEGF eingesetzt wird (Ng et al., 2006).

Mit der Entwicklung von sogenannten „Oligonucleotide-based enzyme capture assays“ (OECA) wurde es möglich auf Basis von Aptameren die Aktivität von Enzymen auch in komplexen Matrices zu messen. Das erste Kit zur Aktivitätsbestimmung von Thrombin wurde 2011 von Müller et al. beschrieben (Müller et al., 2011). Grundlage hierfür war das bereits 2008 beschriebene Aptamer HD1-22 (Müller et al., 2008).

Für die Durchführung solcher Verfahren ist es fundamental notwendig ein spezifisches und mit hoher Affinität bindendes Aptamer gegen das jeweilige Zielprotein der Wahl zu identifizieren. Hierfür hat sich als zentraler experimenteller Prozess das sog. SELEX-Verfahren als effektive Methode etabliert (Mayer, 2009).

2.2 SELEX

SELEX ist ein Akronym für "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment" und beschreibt ein Verfahren zur systematischen Anreicherung von RNA- oder DNA-Aptameren gegen ein bestimmtes Zielprotein. Benutzt wurde dieser Begriff zum ersten Mal 1990 von Tuerk und Gold, welche ein RNA-Aptamer gegen die T4 DNA-Polymerase von Bakteriophagen selektierten. Dies gelang ihnen durch die systematische Wiederholung verschiedener Selektionsschritte (Selektionszyklus): Hierzu wurde zuerst das Zielprotein beispielsweise auf einer Nitrozellulosemembran fixiert und mit einem randomisierten Pool aus RNA-Oligonukleotiden einer bestimmten Länge (RNA-Bibliothek) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die gebundenen Sequenzen nach reverser Transkription durch die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und schließlich nach erneuter Transkription im letzten Schritt als neuer RNA-Pool und Grundlage für den nächsten Selektionszyklus eingesetzt. (Abb. 1) Nach einigen Selektionszyklen konnte so ein hochaffiner RNA-Pool selektiert werden (Tuerk und Gold, 1990).

Anderes gilt für die Selektion von DNA-Aptameren: Zur Amplifikation werden die selektierten Aptamere zuerst mit konventioneller PCR zu Doppelsträngen amplifiziert. Anschließend erfolgt eine Einzelstrangtrennung zur Gewinnung der Aptamerbibliothek zur Durchführung des nächsten Selektionszyklus.

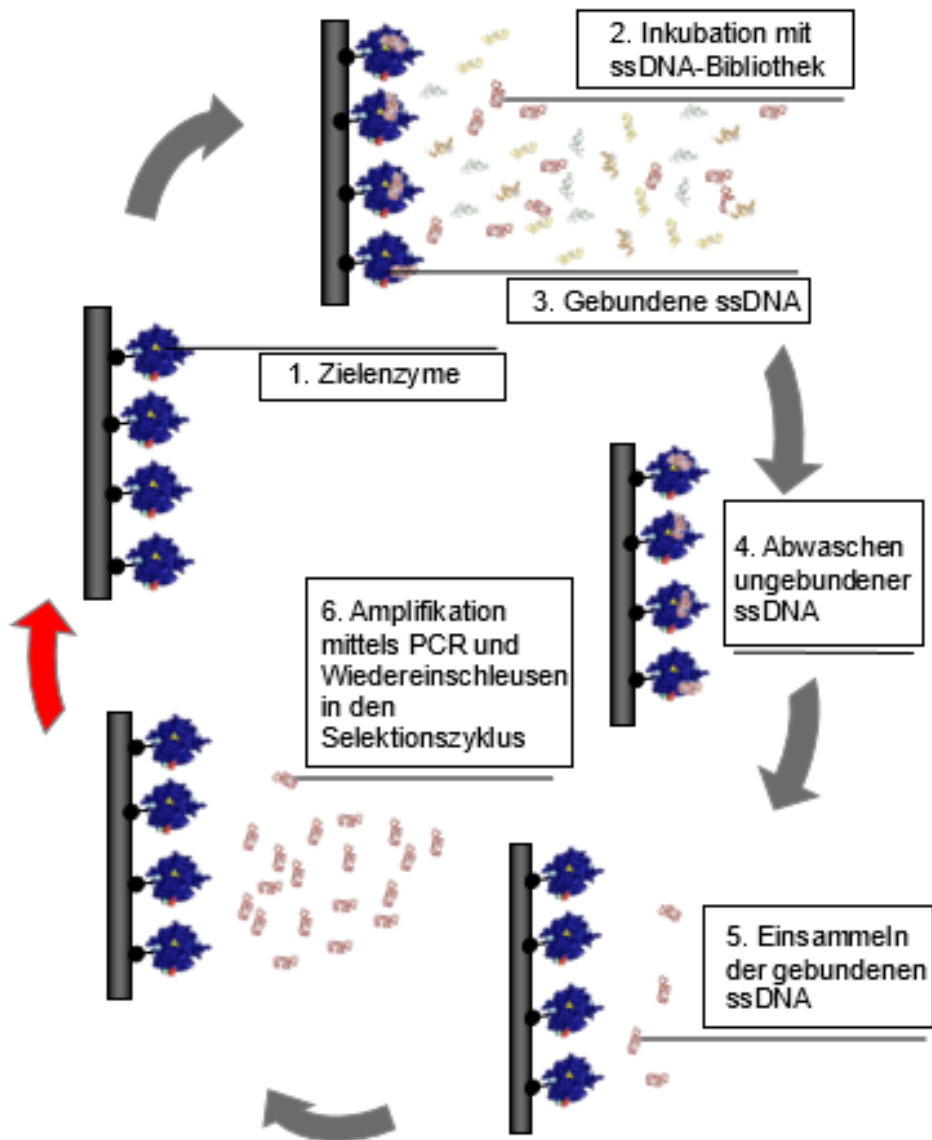


Abb. 1: Schematische Darstellung der Abfolge einer Aptamerselektion mittels konventioneller SELEX. Die gewählten Zielenzyme werden an eine Oberfläche (z.B. Nitrozellulosemembran, magnetische Beads) fixiert (1.) und mit einer randomisierten ssDNA-Bibliothek inkubiert (2.). In ihrer jeweiligen Tertiärstruktur setzen sich geeignete Einzelstränge nun an die Oberfläche des Enzyms (3.) und verbleiben dort nach dem Auswaschen der übrigen ungebundenen Bibliothek (4.). Die verbliebenen Einzelstränge können nun mittels PCR amplifiziert werden (5. Und 6.) bevor sie erneut als Einzelstränge in den Zyklus einschleusenbar sind.

2.2.1 Kapillarelektrophorese-SELEX

Trotz aller Eleganz dieser oben beschriebenen konventionellen SELEX-Methode ergeben sich allein aus der Versuchsanordnung einige Probleme: Zum ersten ist der Verbrauch an Zielproteinen relativ hoch, zum zweiten ist ebenfalls die Anzahl an benötigten Selektionszyklen recht hoch und zum dritten besteht ein Risiko der Non-target Selektion gegen Strukturen, die am Versuchsansatz beteiligt sind (zum Beispiel: Streptavidin, Nitrozellulose, o.ä.). Durch die Kombination von SELEX mit Kapillarelektrophorese (CE) ließen sich diese Probleme deutlich minimieren wie Berezovski et al. 2005 bewiesen. Hierbei macht man sich den elektroosmotischen Fluss (EOF), als das Grundprinzip der Kapillarelektrophorese zu Nutze. (Abb.2)

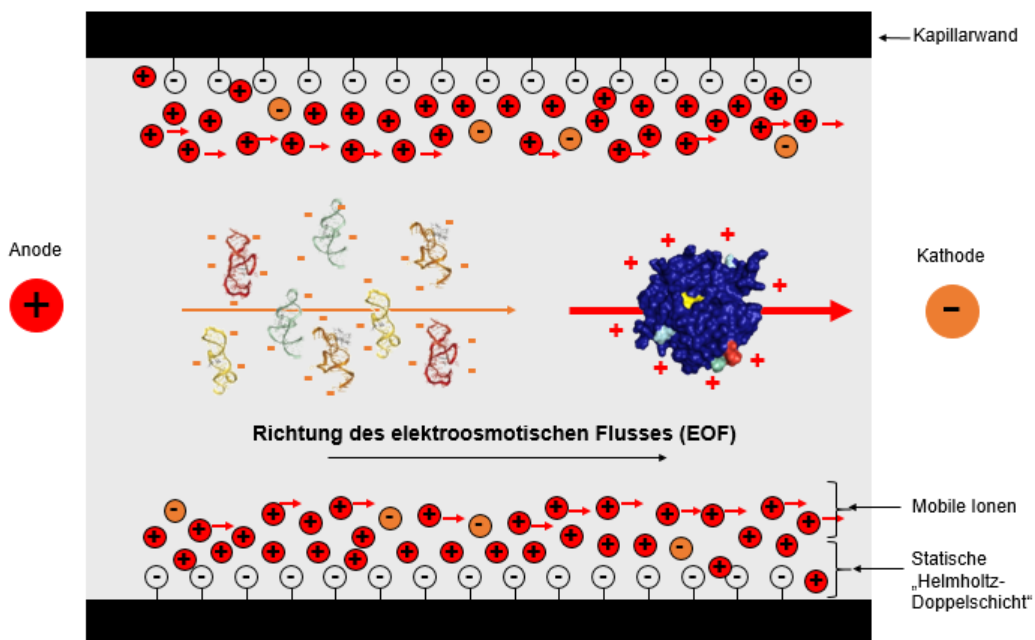


Abb. 2: Der elektroosmotische Fluss (EOF) beruht auf den Elektrolytschichten an der Kapillarwand (in der Abbildung am unteren Rand dargestellt). Hierbei bildet sich an der, mit negativen Silanolgruppen ausgekleideten, Innenwand eine statische Schicht mit positiv geladenen Ionen aus dem Elektrolytpuffer, der die Kapillare füllt. Diese sogenannte „Helmholtz-Schicht“ dient als Grundlage für die „diffuse Schicht“ aus sowohl negativ als auch positiv geladenen Ionen, die sich in Richtung Kapillarinneses anschließt. In dieser diffusen Schicht können nun, bei Anlegen eines elektrischen Feldes, mobile positiv geladene Ionen in Richtung Kathodenende der Kapillare migrieren. Dieses bedingt den Fluss des gesamten Kapillarinhaltes, welcher sich wiederum nach Masse und Ladung auftrennt. Die in der Abbildung dargestellte unterschiedliche Pfeildicke stellt die Migrationsgeschwindigkeit dar: Je dicker, desto schneller die Migration in der Kapillare.

Der EOF innerhalb der Kapillare entsteht durch das Zusammenspiel der Kapillarenwand, die oft mit negativ geladenen Silanol-Gruppen beschichtet ist, und der im Kapillarlumen enthaltenen Pufferlösung, die mit ihren positiv geladenen Kationen an der Silanol-Schicht eine sogenannte monomolekulare Helmholtz-Schicht ausbildet. An diese „statische“ Helmholtz-Schicht lagern sich zum Kapillarinernen hin weitere positiv geladene Moleküle an, welche bei Anlegen einer Spannung nun in Richtung Kathode in Bewegung gesetzt werden. Hierdurch wird nahezu der gesamte Inhalt der Kapillare gleichmäßig in Richtung Kapillarausgang „gepumpt“ und sämtliche Moleküle innerhalb der Pufferlösung nach Größe und Ladung aufgetrennt (Kuhn und Hoffstetter-Kuhn, 1993).

Inkubiert man nun die ausgewählten Zielproteine mit einer randomisierten RNA/DNA-Bibliothek und injiziert diese Mixtur in die Kapillare, so stellt sich die Auftrennung der verschiedenen Moleküle wie in Abbildung 3 aufgezeigt dar.

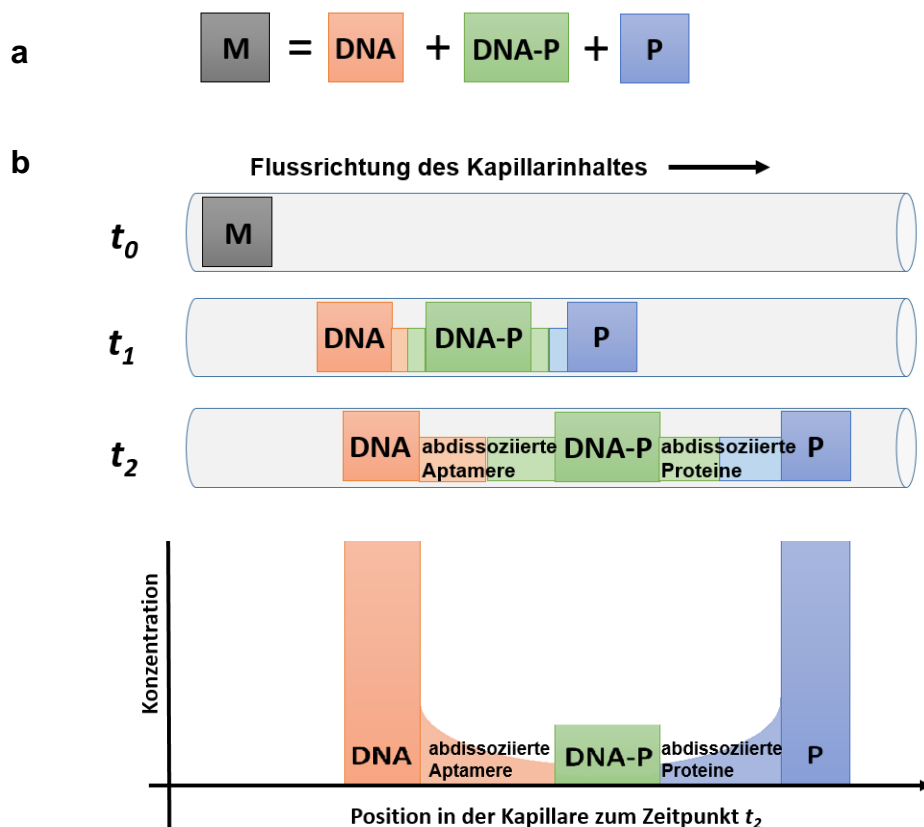


Abb. 3: **a)** Die zur Selektion eingesetzte Mixtur (M) besteht nach Inkubation aus freiem DNA-Pool (DNA), Protein-Aptamerkomplexen (DNA-P) und freiem Protein (P). **b)** Nach Injektion in die Kapillare und Anlegen einer Spannung ist die Mixtur zu einem frühen (t_1) und einem späteren (t_2) Zeitpunkt innerhalb der Kapillare dargestellt. Der Graph unten zeigt die Relation der Konzentrationen der jeweiligen Fraktionen zum Zeitpunkt t_2 . (Modifiziert nach Berezovski et al., 2005)

Bei der sogenannten Kapillarelektrophorese-SELEX (CE-SELEX) existieren zu Beginn somit sowohl freie RNA/DNA-Einzelstränge als auch bereits an das Zielmolekül gebundene, welche nun durch den EOF in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden und so gebundene von nicht gebundenen Sequenzen für den nächsten Zyklus separiert werden können.

Somit lässt sich die Gesamtselektion mit CE-SELEX wie folgt überblicken: Nach anfänglichen Testexperimenten in der Kapillare mit dem Zielprotein zwecks Kalibrierung bzw. Optimierung der Selektionsparameter und Identifikation der jeweiligen Passagezeiten kann der eigentliche Selektionsprozess begonnen werden. Durch die Ergebnisse der Testläufe sollte es nun möglich sein, die Fraktion der Protein-Aptamer-Komplexe gezielt aufzufangen und im Anschluss durch quantitative PCR (qPCR) auf die erhöhte Anwesenheit von DNA-Einzelsträngen im Vergleich zu einem Kontrolllauf ohne Targetprotein zu überprüfen. Ist diese Probe positiv kann mit der Amplifikation fortgesetzt und ein erneuter Selektionszyklus begonnen werden.

Nach einer ausreichenden Menge an Zyklen wird nun die Bindungsstärke der einzelnen Pools und somit der Selektionserfolg etwa mit einem Filterbindungs-Assay überprüft und bei positivem Ergebnis die Einzelstränge auf weitere Bindungseigenschaften untersucht.

Als vorteilhafte Errungenschaften der CE-SELEX lassen sich im Vergleich zu den konventionellen SELEX-Prozeduren zum einen die Selektionsumstände im freien Fluss nennen, die das Risiko einer Non-target-Selektion deutlich verringern lassen, sowie zum anderen der, durch das geringe Selektionsvolumen, geringere Verbrauch der Zielproteinmenge (Berezovski et al., 2005, 2006). Ebenfalls spielt die zeitsparende Komponente durch die wesentlich geringere Anzahl an benötigten Selektionszyklen eine wichtige Rolle (Mosing et al., 2005).

2.3 Zielproteine

Als Zielproteine für die Aptamere Selektion wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Enzyme aus dem Gerinnungssystem eingesetzt. Zur Parameteroptimierung und als Positivkontrolle erfolgte zuerst eine Selektion gegen aktiviertes Protein C (APC), gegen welches bereits erfolgreich Aptamere durch eine konventionelle SELEX-Methode selektiert werden konnten (Müller et al., 2008, 2009). Danach fokussierte sich die Selektion mit Plasmin und aktiviertem Faktor XI (XIa) auf zwei Enzyme, gegen welche eine solche Selektion bisher noch nicht gelang.

2.3.1 Aktiviertes Protein C

Aktiviertes Protein C (APC) ist eine Serinprotease mit antikoagulatorischen, antiinflammatorischen und anti-apoptischen Funktionen im menschlichen Körper. In inaktivem Zustand befindet sich das Zymogen Protein C (PC) in der Zirkulation und wird erst nach Bindung an den Endothelialen-Protein-C-Rezeptor (EPCR) durch einen zuvor entstandenen Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin auf der Endothelzelloberfläche aktiviert. Die aktivierte Form kann sowohl am EPCR gebunden bleiben oder von diesem dissoziieren. In gebundener Form scheint dieser Komplex über die Interaktion mit Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PAR) eine Funktion in der Herabregulierung zellulärer Zytokine wie z.B. Tumornekrosefaktor oder Interleukin-6 zu haben, was somit zu einer Entzündungshemmung führt. In dissoziierter Form bindet APC an Protein S (PS) und inaktiviert in diesem Zustand die aktivierten Gerinnungskofaktoren V (Va) bzw VIII (VIIIa), was in einer verminderten Thrombingenerierung resultiert (Esmon, 2003). Klinische Studien zeigten entsprechend, dass ein Protein C-Mangel vermehrt zu mikrovaskulären Thrombosen führt (Marlar und Neumann, 1990).

Über die anti-apoptischen Funktionen ist bekannt, dass APC über die Aktivierung von PAR-1 wiederum an einer Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 beteiligt ist, dass APC das proapoptische Bax/Bcl-2-Verhältnis normalisiert und es zudem den Kaspase-3-Signalweg inhibiert (Cheng et al., 2003).

Durch diese herausragende Stellung stellt sich APC im Allgemeinen als ein wichtiges Zielprotein für die klinische Forschung dar. Um dessen Aktivität bzw. den Grad der Aktivierung effektiv im Plasma messen zu können, konnten bereits Testkits entwickelt werden, die auf

der hohen Spezifität und Affinität von DNA-Aptameren basieren und somit spezifisch APC von PC unterscheiden können (Müller et al., 2012).

2.3.2 Plasmin

Wie auch APC, ist Plasmin eine Serinprotease. Mit dem über die Leber gebildeten Plasminogen liegt ein inaktives Zymogen vor, welches durch den Gewebeplasminogenaktivator (tPA) und Urokinase (uPA) in die aktivierte und fibrinolytische Form Plasmin überführt wird. Stärkster Stimulus für eine Aktivierung von Plasminogen ist Fibrin, welches sowohl Plasminogen als auch tPA bindet und so zur Plasminaktivierung beiträgt. Die Effektivität hängt hier besonders von der Anzahl an Lysin-Bindungsstellen des Fibrins ab (Draxler und Medcalf, 2014). Weitere Stimuli sind u.a. Thrombin, Bradykinin, Vasopressin, Adrenalin, körperliche Bewegung, venöse Gefäßverschlüsse oder Scherkräfte auf die Gefäße (Hajjar, 2003). Von den beiden genannten Aktivatoren ist tPA der stärkere (Cesarman-Maus und Hajjar, 2005). Plasmin besitzt sowohl fibrinolytische als auch nicht-fibrinolytische Aktivität. Hierfür besitzen sowohl Fibrin als auch das Vorläuferprotein Fibrinogen spezielle Plasminbindungsstellen, welche ihre Inaktivierung durch Plasmin-vermittelte Proteolyse fördern. Als Spaltprodukte entstehen aus Fibrinogen die Fragmente D, E, X und Y und aus Fibrin die, klinisch relevanten, D-Dimere. Dies führt in physiologischem Zustand zur Verhinderung des finalen Clotting-Prozesses sowie nach primärer Wundheilung zur Rückbildung des entstandenen Fibrin-Clots (Cesarman-Maus und Hajjar, 2005). Damit die proteolytische Plasminaktivität jedoch nicht unkontrollierte Ausmaße annimmt existieren physiologische Inhibitoren, wie z.B. α_2 Antiplasmin oder Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1/PAI-2). Die erfolgreiche Erforschung dieses Fibrinolyse-Signalweges und des Wissens um eine gezielte tPA-induzierte Plasminogenaktivierung führte Anfang der 90er Jahre zu einem regelrechten Boom in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts durch eine sogenannte Lyse, welche heutzutage durch die Katheter-gestützte Koronarintervention abgelöst wurde. Aktuell findet die tPA-Fibrinolyse noch vor allem in der zeitnahen (3 h) Behandlung des akuten Schlaganfalls Anwendung, was zum einen zwar mit einem besseren Outcome, zum anderen jedoch mit einem erhöhten intrazerebralen Blutungsrisiko einhergeht (Koroshetz, 1996).

Die nicht-fibrinolytische Aktivität von Plasmin ist bisher vor allem für das zentrale Nervensystem erforscht. Hier weiß man mittlerweile, dass tPA wahrscheinlich nicht nur eine Rolle sowohl in physiologischen Prozessen, wie synaptische Plastizität, Lernen und Verhalten spielt, sondern auch in pathologischen Prozessen, wie Demenz, Multiple Sklerose oder zerebrale Ischämien (Draxler und Medcalf, 2014).

2.3.3 Aktivierter Faktor XI

Als Bestandteil des intrinsischen Teils der Gerinnungskaskade führt der aktivierte Faktor XI (FXIa) über die nachfolgende Aktivierung von Faktor IX zu Faktor IXa letztendlich zur Fibringenerierung und somit zur Blutgerinnung. Dabei entsteht die Serinprotease Faktor XIa erst durch Aktivierung durch die Protease Faktor XIIa, α -Thrombin, oder Faktor XIa selbst (Autoaktivierung) aus dem Zymogen Faktor XI (Naitos und Fujikawa, 1991). Dieses zirkuliert im Blut in einem Komplex mit dem hochmolekulargewichtigen Kininogen (HK).

Eine Besonderheit stellt die Struktur des Proteins dar: Faktor XI besteht aus zwei identischen Untereinheiten und stellt somit eine seltene Dimere Protease dar, welche sich strukturell deutlich von den Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren unterscheidet. Jedes Monomer wiederum besteht aus einer Proteasen-Domäne sowie vier weiteren Untereinheiten, den sogenannten Apple-Domänen, auf welche sich die Bindungsstellen für Thrombin, HK, Heparin, GP1b und Faktor IX verteilen (Emsley et al., 2010).

Welchen Stellenwert Faktor XI in der Kaskade der Blutgerinnung einnimmt, konnte bisher nicht eindeutig dargestellt werden: Obwohl Faktor XI der „kontakt-aktivierten“ Gerinnungskaskade zugeordnet wird, stellten Naitos und Fujikawa bereits 1991 dar, dass bei Patienten mit Faktor-XI-Mangel eine ausgeprägte Blutungsneigung bestand. Im Gegensatz zu Patienten mit Faktor-XII-Mangel, wo eine entsprechende Veranlagung nicht ausgemacht werden konnte (Naitos und Fujikawa, 1991). Hier wurde ein alternativer Aktivierungsweg vermutet, welcher im Folgenden beschrieben ist: Zu Beginn der Plättchen-vermittelten Hämostase aktiviert „früh“-gebildetes Thrombin über einen „autoaktivierungs-Loop“ Faktor XI unabhängig von Faktor XIIa. Dieser Effekt führt im weiteren Verlauf zu einer Amplifikation von Thrombin. Ein weiterer Effekt ist, dass erst bei großen Mengen an Thrombin der sogenannte Thrombin-activatable Fibrinolysis-Inhibitor (TAFI) aktiviert wird, welcher Fibrinolyse inhibieren kann (Carrieri et al., 2011). Hierauf aufbauend konnten Carrieri et

al. Faktor XI somit wiederum als einen zentralen Bestandteil der Plättchen-vermittelten Hämostase ausmachen (Carrieri et al., 2011).

Bei Patienten mit Faktor XI-Mangel (Hämophilie C) führt dies zu sehr variablen Symptomen von verlängerten Blutungszeiten bis hin zu lebensbedrohlichen hämorrhagischen Diathesen. Gehäuft tritt diese seltene Erkrankung in der Bevölkerungsgruppe der Ashkenazi-Juden auf und basiert auf Punktmutationen im Faktor-XI-Gen. Hierfür wurden bisher drei Punktmutationen beschrieben (Typ I, II und III), welche in sehr niedrigen FXI-Plasmaspiegeln resultieren. Auffällig werden solche Patienten im Normalfall erst durch die verlängerte Blutungszeit bei Traumen oder Operationen (Asakai et al., 1992). Durch den Einfluss von FXI auf die Fibrinolyse geschieht dies vor allem bei Eingriffen am Mund-/Nasen- oder Rachenraum sowie an den harnableitenden Wegen, da hier normalerweise eine verstärkte Fibrinolyse herrscht (von dem Borne et al., 1995; Salomon, 2006).

Die genaue Einordnung von Faktor XI ist demnach weiterhin Stand der Forschung und Gegenstand kontroverser Diskussionen (Bolton-Maggs, 2009).

2.4 Ziel der Arbeit

Aptamere stellen als verhältnismäßig neue Substanzklasse ein attraktives Tool mit enormem Potential in der Forschung sowie im klinischen Gebrauch dar, welches im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern vor allem sehr günstig in der Herstellung größerer Mengen ist.

Vor allem aber aufgrund der im Vergleich zu Antikörpern hohen Spezifität von Aptameren erschien es als sinnvoll die schon begonnene Entwicklung Aptamer-basierter Testsysteme zur quantitativen Bestimmung von aktivierten Gerinnungsfaktoren in Plasmaproben voran zu treiben und die Bandbreite an messbaren Zielproteinen zu erweitern. Zum anderen war die Methode der CE-SELEX noch nicht lange im Bonner Institut etabliert, so dass diese Arbeit unter anderem das weitere Potential der Methode ausloten und weitere Erkenntnisse zur Optimierung der Methode erbringen sollte. Für diesen Fall erschienen die Gerinnungsfaktoren Plasmin sowie Faktor XIa als ideale Zielproteine, da beide zum einen eine wichtige Rolle in der Hämostase bzw. Fibrinolyse spielen, andererseits aber mit konventionellen SELEX-Methoden gegen diese Enzyme bisher keine potenten Aptamere selektiert werden konnten.

So ergäben sich im Falle einer erfolgreichen Selektion neue Aptamere, die auf ein mögliches Potential im klinischen Gebrauch hin getestet werden könnten.

3. Material

3.1 Reagenzien

3.1.1 Verwendete Enzyme

Humanes rekombinantes APC war in Form von Xigris[®] verfügbar, welches von Eli Lilly and Company (Indianapolis, USA) hergestellt wurde. Xigris[®] ist eine rekombinante Form des humanen APCs und wurde in humanen Zelllinien produziert. Es wurde bis 2011 bei Patienten mit schwerer Sepsis angewandt, dann aber vom Markt genommen, da in aktuelleren Studien keine signifikanten Überlebensvorteile herausgestellt werden konnten. (Eli Lilly and Company, Pressemitteilung vom 25.10.2011)

Humanes Plasmin sowie humaner FXI wurden von der Firma HTI (Haematologic Technologies Inc.; Essex, USA) hergestellt, aufgereinigt und charakterisiert.

3.1.2 Randomisierte DNA Bibliothek IHT1 und zugehörige Oligonukleotide

Die als Grundlage für die Aptamerelektion eingesetzte randomisierte, einzelsträngige (ss) DNA Bibliothek IHT1 bestand aus einer 40-Basen langen randomisierten Region, die in 5'-Richtung von der 21-Basen langen Primerbindungsstelle des Forward-Primers (IHT1FW) und in 3'-Richtung von der 20-Basen langen Primerbindungsstelle des Reverse-Primers (IHT1REV) flankiert wurde. Diese Bindungsstellen ermöglichten die im Selektionsprozess erforderliche Amplifikation aller IHT1-basierten Sequenzen mittels PCR. Die Sequenz des sog. Capture-Moleküls IHTREVcaptB ist identisch mit den ersten elf Basen des IHT1REV-Primers und zudem am 5'-Ende biotinyliert. Es wurde nach der Amplifikation für die Isolierung der ssDNA am Ende eines jeden SELEX-Zyklus eingesetzt. HS02-52G ist ein bekanntes DNA-Aptamer, welches an APC bindet und in dieser Arbeit als Kontrollmolekül eingesetzt wurde.

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth, Wolfurt, Österreich hergestellt.

In Tabelle 1 sind alle Sequenzen der primären Oligonukleotide, die in dieser Arbeit benutzt wurden, dargestellt.

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotidsequenzen. Dargestellt in 5'-3' Richtung

Oligonukleotid	Modifikation	Sequenz
IHT 1	-	5'-AAG CAG TGG TAA GTA GGT TGA NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NTC TCT TCG AGC AAT CCA CAC-3'
IHT1FW	-	5'-AAG CAG TGG TAA GTA GGT TGA-3'
IHT1REV	-	5'-GTG TGG ATT GCT CGA AGA GA-3'
IHTREVcaptB	5'Biotin-TEG	5'-GTG TGG ATT GC-3'
HS02-52G	-	5'-GCC TCC TAA CTG AGC TGT ACT CGA CTT ATC CCG GAT GGG GCT CTT AGG AGG C-3'

3.1.3 Sonstige Reagenzien

DNA T4 Ligase, New England Biolabs [NEB] (Frankfurt am Main).

dNTPs, Thermo Fisher Scientific.

Fluorogene Substrate (Tabelle 2), Loxo (Dossenheim, Deutschland), (PCa-5791) sowie Bachem (Weil am Rhein, Deutschland), (I-1575, I-1275).

Tab. 2: Substrate zur jeweiligen Aktivitätsmessung der Zielproteine mit ihrer spezifischen Aminosäuresequenz

Zielprotein	Substratname	Aminosäuresequenz
APC	PCa-5791	Pyr-Pro-Arg-AMC
Faktor XIa	I-1575	Boc-Glu-Ala-Arg-AMC
Plasmin	I-1275	MeOSuc-Ala-Phe-Lys-AMC

Formamid, Sigma-Aldrich (München)

High pure PCR Cleanup Microkit, Roche (Mannheim)

Hot firepol® DNA-Polymerase-Kit, Solis Biodyne (Tartu, Estland)

HotStarTaq Plus DNA-Polymerase-Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)

M13 Fw primer, Eurofins Genomics GmbH (Eurofins, Ebersberg)

M13 Rev primer, Eurofins

Nukleotidkinase T4, NEB

Sequencing Kit, Big Dye Terminator v.1.1, Applied Biosystems, (Austin, TX, USA)

ROX Referenz-Farbstoff, 50x, Qiagen (Hilden)

SYBR-Green, Thermo Fisher Scientific

Vektor p-GEM-T, Promega (Mannheim).

3.2 Verwendete Materialien

Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes, (Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland)

Agarboden, Ampicillin-haltig (1 µl Ampicillin/1 ml Agar), in-house

Dynabeads® M-280 Streptavidin, 10 mg/ml, (Thermo Fisher Scientific)

Eppendorfcups (1,5 und 2 ml), (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland)

G25-Chromatographie-Säulchen, GE Healthcare Life Sciences (GE, Freiburg).

JM109 Zellen (DH5a), Promega

Kapillare für Kapillarelektrophorese (50 µm ID, 375 µm AD, Länge 67 cm, silica-fused),

Beckman Coulter (Krefeld).

Micro Bio-Spin™ Chromatographie-Säulchen, Bio-Rad

Molekulargewichtsmarker XIII, 50 bp (Roche, Mannheim, Deutschland)

Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland)

Whatman™-Löschpapier, GE

3.3 Verwendete Pufferlösungen

Alle Pufferlösungen, die für die Kapillarelektrophorese verwendet wurden (der Auftrennungspuffer B15, die Waschlösungen NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M und dH₂O), wurden vor dem Einsatz in der Kapillare gefiltert, um einen Verschluss dieser durch Schwebstoffe zu verhindern.

1x Phosphate buffered saline (PBS)

- 800 ml dH₂O
- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,81 g Na₂HPO₄
- pH: 7.4
- mit dH₂O auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt

1x Auftrennungspuffer B15 (Kapillarelektrophorese):

- 25 mM Tris
- 30 mM NaCl
- 1 mM KCl
- 1 mM CaCl₂
- 1 mM MgCl₂
- pH-Wert: 8,3

10 x TBE Puffer (Gelelektrophorese):

- 0,89 M Tris
- 0,89 M Borsäure
- 20 mM EDTA
- pH 8,3

6 x Auftragungspuffer (Gelelektrophorese):

- 0,25 % (Gewicht/Volumen) Bromphenolblau
- 0,25 % (Gewicht/Volumen) Xylencyanol FF
- 30 % (Volumen/Volumen) Glycerol in H₂O

B&W-Puffer (Einzelstrangtrennung):

- 10 mM Tris
- 2 M NaCl
- pH 7,5

Waschpuffer (Einzelstrangtrennung):

- 10 mM Tris
- 20 mM NaCl
- pH 7,6

Aufbewahrungspuffer (Einzelstrangtrennung):

- 1 x PBS
- 0,1 % BSA
- 0,02 % NaN₃
- pH 7,4

T4-Polynukleotidkinasen-Puffer (PKN) (Filterbindungs-Assay):

- 70 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM Dithiothreitol
- pH 7,6

1x Filterbindungspuffer (Filterbindungs-Assay):

- 1x PBS
- 1 mM MgCl₂
- 1 mM CaCl₂
- 1 mg ml⁻¹ tRNA
- 1 mg ml⁻¹ BSA

1x Waschpuffer (Filterbindungs-Assay):

- 1x PBS
- 1 mM MgCl₂
- 1 mM CaCl₂

LB-Medium

- 0,5 % Hefeextrakt
- 1,0 % Pepton Nr. 140
- 1,0 % NaCl
- pH 7,0
- Autoklavieren: 20 min, 121 °C

3.4 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte werden im Abschnitt 3 (Methoden) unter der jeweiligen Durchführung beschrieben. Daneben wurden eingesetzt:

Pipetten (1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl) Eppendorf GmbH

pH-Meter, Mettler Toledo (Giessen)

Wasserbad, Memmert (Schwabach)

Gelelektrophorese-System, Biometra (Jena)

Vortexer, Velp Scientifica (Usmate, Italien)

4. Methoden

4.1 Umpufferung der verwendeten Enzyme

Vor jeder Selektion wurden die zu verwendenden Enzyme in den zur Kapillarelektrophorese verwendeten Puffer B15 umgepuffert. Hierzu wurden Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes zuerst mit 1000 µl B15-Puffer befüllt und 10 Min bei 2000 xg zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend die Enzymlösung hinzugegeben, die wiederum auf ein Endvolumen von 1000 µl mit B15-Puffer aufgefüllt wurde. Anschließend wurde ein weiteres Mal bei 2000 xg zentrifugiert – diesmal 15 Minuten. Dieser Zentrifugationsschritt wird nach erneutem Auffüllen mit Puffer B15 ebenfalls wiederholt. Anschließend wird das sich über dem Filter befindliche Volumen abpipettiert und das Volumen ausgemessen. Abschließend konnte hieraus die Konzentration der umgepufferten Enzyme errechnet werden.

4.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zur Evaluation des Einflusses der Selektionsbedingungen auf die Enzymaktivität der jeweiligen Zielenzyme wurden diese in logarithmisch aufsteigenden Konzentrationen mit den unter Punkt 2.1.3 aufgeführten, spezifischen Fluoreszenzsubstraten inkubiert und die Fluoreszenzintensität mittels eines Fluoreszenzdetektors gemessen. Hierzu wurden für sämtliche verwendete Konzentrationen Doppelwerte gemessen und der entsprechende Median gebildet. In Relation zu einer Referenzkurve, für deren Erstellung die Aktivitätsmessung in einem Medium mit optimaler Enzymaktivität durchgeführt wurde, konnte so auf die verbliebene Restaktivität unter verschiedenen Bedingungen geschlossen werden. Für unsere Experimente verwendeten wir den Multi-Detektionsreader „Synergy 2“ der Firma Biotek (Bad Friedrichshall, Deutschland).

4.3 Kapillar Elektrophorese

4.3.1 Verwendetes Gerät und Kapillaren

Alle Kapillar Elektrophorese (CE) Prozeduren wurden mit dem Apparat ProteomeLab PA 800 der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Er ist ausgestattet

mit einem Photodetektor (Photo Diode Array, PDA), welcher die Absorbtion bei einer Wellenlänge von 214, 240 sowie 254 nm misst. Die Kapillaren wurden in die entsprechende Kapillarkassette eingefädelt und schließlich auf eine Endlänge von 60,2 cm gekürzt. Das Detektionsfenster, durch welches die Absorbtion des Kapillarinhaltes gemessen wurde, befand sich somit 10,2 cm vor dem Ausgang der Kapillare.

4.3.2 Allgemeine Vorgehensweise zur Vorbereitung der Ansätze zur Bestimmung der Retentionszeiten und zur Aptamer-Selektion

Vor Injektion in die CE wurde die, im Selektionspuffer B15 auf 25 μ M verdünnte DNA-Bibliothek für 2 Minuten bei 85 °C erhitzt und anschließend auf Eis auf 4 °C abgekühlt. Durch diesen Vorgang sollten die Oligonukleotide in ihre intrinsischen Konformationen gefaltet werden.

Nach Durchführung des entsprechenden Leerlaufs (nur DNA-Bibliothek) wurde der Ansatz erneut wie oben beschrieben erhitzt, abgekühlt und anschließend das Zielenzym in der niedrigsten der beiden Konzentrationen (in jedem Selektionszyklus wurden mindestens zwei Konzentrationen des Zielenzym eingesetzt) hinzugegeben. Diese Mischung wurde anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

Nach Durchführung des ersten Selektionslaufes wurde zur Ausgangsmischung eine entsprechende Menge an Enzym sowie ggf. B15-Selektionspuffer hinzugegeben, bis die Zielenzym-Konzentration nun der der höheren entsprach. Dies wurde nun erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es in den zweiten Selektionslauf eingesetzt wurde.

Alle Ansätze, die jeweils das Ziel-Enzym, die DNA-Bibliothek oder, im Rahmen der eigentlichen Aptamerselektion, eine Mischung dieser beiden Komponenten enthielten, wurden so pipettiert, dass der finale Ansatz mittels 1 x B15 gepuffert wurde. Somit glich die Puffer-Zusammensetzung der der während der eigentlichen CE verwendeten, um eine saubere Auftrennung der Enzyme und DNA-Moleküle zu gewährleisten.

4.3.3 CE-Bedingungen

Das Programm, mit welchem die Bestimmung der einzelnen Retentionszeiten sowie die Selektionsläufe durchgeführt wurden, ist in der nachfolgenden Tabelle 3 dargestellt. Hierbei handelt es sich bei den ersten zwölf Teilschritten um Konditionierungsläufe, welche

für die ausreichende und notwendige Konzentration an Ionen in der Kapillare sorgten. Diese war wiederum wichtig und Voraussetzung für den EOF, welcher das Grundprinzip der Auftrennung während der CE darstellt. Die Dauer des letzten Teilschrittes der eigentlichen Auftrennung war variabel und wurde an die jeweiligen Anforderungen des Laufes angepasst.

Nach jedem Lauf wurden die restlichen, sich in der Kapillare befindenden Komponenten durch einen speziellen Spüllauf herausgewaschen (siehe Tabelle 4). Hierbei wurden die verbliebenen Komponenten zurück zum Inlet der Kapillare gespült, um eine Kontamination des Outlets mit nicht gebundenen DNA-Sequenzen möglichst zu vermeiden.

Tab. 3: Allgemein verwendetes CE-Programm

Aktion	Dauer	Druck	Spannung	Kapillar Eingang	Kapillar Ausgang
Druckspülung	2 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	HCl 0,1 M
Warten	1 min	-	-	HCl 0,1 M	HCl 0,1 M
Warten	1 min	-	-	HCl 0,1 M	HCl 0,1 M
Druckspülung	2 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	NaOH 0,1 M
Warten	1 min	-	-	NaOH 0,1 M	NaOH 0,1 M
Warten	1 min	-	-	NaOH 0,1 M	NaOH 0,1 M
Druckspülung	2 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	dH ₂ O
Warten	1 min	-	-	dH ₂ O	dH ₂ O
Warten	1 min	-	-	dH ₂ O	dH ₂ O
Druckspülung	2 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	B15
Warten	1 min	-	-	B15	B15
Warten	1 min	-	-	B15	B15
Auftrennungs- vorbereitung	5 min	-	15 kV, mit 2 min Rampe	B15	B15
Druck-injek- tion	5 sec	4 psi	-	Library-Pro- tein-Mix	B15
Auftrennung	X min	20 psi, zu beiden Seiten	25 kV, mit 0,5 min Rampe	B15	B15-Pro- ben-auffang

Tab. 4 Kapillar-Spülprogramm. Die Spülrichtung ist hier rückwärtig gewählt, um das Outlet nicht durch folgende Teile des DNA-Pools zu kontaminieren.

Aktion	Dauer	Druck	Spannung	Kapillar- eingang	Kapillar- ausgang
Spülen	5 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	dH ₂ O
Spülen	5 min	50 psi, rückwärts	-	Leer	dH ₂ O

4.3.4 Bestimmung der Retentionszeiten

Um eine erfolgreiche Selektion zu ermöglichen, war die genaue Bestimmung der Durchflusszeit (Retentionszeit) sowohl der DNA-Bibliothek als auch des jeweiligen Zielenzym notwendig.

Die Retentionszeit der DNA-Bibliothek wurde nach Injektion einer 25 μM Lösung der IHT1-Bibliothek bestimmt. Dafür wurde eine lange Auftrennungszeit von 60 Minuten eingestellt. Nach dem Durchlauf des gesamten Peaks durch das PDA-Detektionsfenster wurde der Lauf manuell gestoppt.

Die Retentionszeiten von APC, Plasmin und FXIa wurden auf gleiche Weise bestimmt. Lediglich die eingesetzten Konzentrationen unterschieden sich: APC: 5 μM , Plasmin: 8,55 μM und FXIa: 2 μM .

4.3.5 Aptamer-Selektionen

4.3.5.1 APC als Zielenzym

Für den ersten Selektionszyklus wurde ein Mix aus 25 μM IHT1 Bibliothek und 0,5 μM APC in die Kapillare injiziert. Für alle weiteren Zyklen wurde eine DNA-Konzentration von 0,5 μM verwendet, während die Konzentration von APC schrittweise gesenkt wurde. Dies sollte zu einem erhöhten Selektionsdruck führen. Die vermeintlichen APC-Aptamer-Komplexe wurden am Kapillarende nach 20-minütiger Auftrennung in 50 μl B15-Puffer aufgefangen.

4.3.5.2 Faktor XIa als Zielenzym

Gegen FXIa wurde unter ähnlichen Selektionsbedingungen selektiert. Auch hier bestand der erste Zyklus aus einer beginnenden DNA-Konzentration von 25 μM , allerdings wurde die Enzym-Konzentration zu Beginn auf 1 μM FXIa gesetzt. Während der nachfolgenden Selektionszyklen wurde die Konzentration ebenfalls kontinuierlich gesenkt. Im Gegensatz zur Selektion von APC wurde das Selektionsfenster hier jedoch in drei Fraktionen aufgeteilt, deren Inhalte getrennt in jeweils 50 μl B15-Puffer aufgefangen wurden (nach 0-3,8 min; nach 3,8-10,8 min und nach 10,8-15,6 min).

4.3.5.3 Plasmin als Zielenzym

Die Selektion von Aptameren gegen Plasmin wurde mit einem Zyklus begonnen, in welchem die Konzentration der IHT1-Bibliothek bei 25 μM und die des Zielenzym bei 1 μM lagen, wobei die Konzentration von Plasmin auch hier mit zunehmender Zykluszahl kontinuierlich gesenkt wurde. Ähnlich wie in der Selektion gegen FXIa wurde das Selektionsfenster jedoch in drei Fraktionen aufgeteilt, deren Inhalte getrennt in jeweils 50 μl B15-Puffer aufgefangen wurden (nach 0-3,9 min; nach 3,9-6,9 min und nach 6,9-14 min).

4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-basierte Verfahren

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz nach dem engl.: PCR) ist ein mittlerweile weit verbreitetes Verfahren in der molekularen Biochemie, welches zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen verwendet wird. Das Verfahren beruht auf dem komplementären Basencode eines DNA-Stranges. So ist es möglich, dass nach Denaturierung und nachfolgender Anlagerung der Primer an die entstandenen Einzelstränge, diese Einzelstränge vom 3'-Ende gebundenen Primer ausgehend durch eine thermostabile DNA-Polymerase durch Hinzufügen und nachfolgendem Verbinden komplementärer Nukleotidbasen zum doppelsträngigen Ausgangsmolekül ergänzt werden.

Die Vervielfältigungen der durch die Kapillarelektrophorese selektierten ssDNA-Moleküle erfolgte in zwei Schritten. Zuerst kam eine konventionelle PCR zum Einsatz, bei der sowohl Forward (FW)- als auch Reverse (Rev)-Primer eingesetzt wurden, was zu einer exponentiellen Amplifikation der Ausgangssequenzen unter Bildung von doppelsträngigen PCR-Produkten führte. Die so entstandenen Produkte wurden in einem nächsten Schritt verdünnt und in eine asymmetrische PCR, bei welcher kein Rev-Primer zugegeben wurde, eingesetzt, wobei während der Reaktionen neben Doppelsträngen auch einzelsträngige Aptamer-Moleküle hergestellt wurden. Diese wurden in einem weiteren Schritt mittels Capture und Release (CaR) isoliert (siehe Punkt 4.6), um sie in den nächsten Selektionszyklus einsetzen zu können.

Die semiquantitative Detektion der selektierten Aptamere wurde mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) durchgeführt. Hierbei kam der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen zum Einsatz (siehe 3.1.3).

Als Grundlage für alle (q)PCR Ansätze wurde das HotStarTaq Plus DNA-Polymerase-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt. Für die konventionellen PCR-Reaktionen wurde der Thermocycler PTC-0220 Dyad der Firma BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet. Die qPCR wurde mit einem 7500 Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

4.4.1 Konventionelle, exponentielle DNA-Amplifikation

Die verwendeten Reaktionsansätze sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung des Mastermixes, der für die konventionellen PCRs benutzt wurde.

Reagenz	Volumen pro Reaktion (100 µl totales Reaktionsvolumen)		
	<i>Probe</i>	<i>Positivkontrolle</i>	<i>Negativkontrolle</i>
dH ₂ O	81,95 µl	81,95 µl	86,95 µl
10x PCR Puffer	10 µl	10 µl	10 µl
dNTPs	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
FW-Primer (100 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
REV-Primer (100 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
HotStarTaqPlus DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
IHT1 (10 ⁴ Moleküle/µl)	-	5 µl	-
CE-Pool (Outlet)	5 µl	-	-

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse und Erfahrungen der Arbeitsgruppe konnten wir die Anzahl der Amplifizierungszyklen direkt auf 35 festlegen: So benutzten wir das nachfolgend in Tabelle 6 dargestellte Amplifikationsprofil.

Tab. 6: Programm, das für die konventionelle PCR-Amplifizierung verwendet wurde.

I: Aktivierung der Polymerase	II: PCR Amplifikation
1 Zyklus	35 Zyklen
95 °C für 3 Minuten	Denaturierung: 95 °C für 30 sec
	Hybridisierung: 56 °C für 30 sec
	Elongation: 72 °C für 30 sec

4.4.2 Asymmetrische PCR

Dadurch, dass in diesem Reaktionsansatz nur die Primer für die Forward-Bindungsstelle hinzugegeben wurden und somit die Anzahl der vorhandenen Reverse-Primer, welche lediglich aus dem eingesetzten, verdünnten Produkt der zuvor durchgeführten, exponentiellen Amplifikation stammen, deutlich niedriger lag, erfolgt vornehmlich eine Vervielfältigung der einzelsträngigen Ursprungssequenzen aus der im ersten Selektionszyklus verwendeten IHT1-ssDNA-Bibliothek.

Tabelle 7 zeigt den Pipettierplan für Mastermix, Probe und Kontrollproben für die Einzelstrangherstellung durch eben diese asymmetrische PCR. Als Probe wurde eine 1:10 Verdünnung des Produktes der zuvor durchgeführten konventionellen PCR in hochreinem Wasser verwendet. Das verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 8 aufgezeigt. Hier wurden 40 Amplifikationszyklen verwendet, um eine ausreichende Menge an ssDNA zu erlangen.

Tab. 7: Zusammensetzung des Mastermixes, der für die asymmetrischen PCRs benutzt wurde.

Reagenz	Volumen pro Reaktion (100 µl totales Reaktionsvolumen)		
	<i>Probe</i>	<i>Positivkontrolle</i>	<i>Negativkontrolle</i>
dH ₂ O	77,95 µl	77,95 µl	87,95 µl
10x PCR Puffer	10 µl	10 µl	10 µl
dNTPs	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
FW-Primer (100 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
REV-Primer (100 µM)	-	-	-
HotStarTaqPlus DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Positivkontrolle des konv. PCR-Ansatzes	-	10 µl	-
PCR-Produkt (0,1x)	10 µl	-	-

Tab. 8: Programm, das für die asymmetrische PCR-Amplifizierung verwendet wurde.

I: Aktivierung der Polymerase	II: PCR Amplifikation
1 Zyklus	40 Zyklen
95 °C für 3 Minuten	Denaturierung: 95 °C für 30 sec
	Hybridisierung: 56 °C für 30 sec
	Elongation: 72 °C für 30 sec

4.4.3 Realtime-PCR (qPCR)

Als Grundlage diente auch hier das HotStarTaq Plus DNA-Polymerase-Kit der Firma Qiagen. Tabelle 9 beschreibt die Pipettierschemata für die verschiedenen Ansätze der qPCR, wohingegen Tabelle 10 das gewählte Thermocycle-Profil darstellt. Als DNA-Fluoreszenzfarbstoff während der Amplifikation wurde SYBR Green verwendet, wobei die Fluoreszenz während der Primerhybridisierung eines jeden Zyklus vom Apparat gemessen wurde.

Tab. 9: Pipettierschema zum Ansatz der verwendeten qPCR-Reaktionen.

Reagenz	Volumen pro Reaktion (50 µl totales Reaktionsvolumen)		
	<i>Probe</i>	<i>Positivkontrolle</i>	<i>Negativkontrolle</i>
dH ₂ O	32,85 µl	32,85 µl	37,85 µl
10x PCR Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂	3 µl	3 µl	3 µl
dNTPs	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
FW-Primer	1 µl	1 µl	1 µl
REV-Primer	1 µl	1 µl	1 µl
SYBR Green	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
ROX Ref.-Farbstoff (50x)	1 µl	1 µl	1 µl
HotStarTaqPlus DNA Polymerase (5U/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
IHT1 (10 ⁴ Mole- küle/µl)	-	5 µl	-
CE-Probe	5 µl	-	-

Tab. 10: Programm des RealTime-Thermocyclers zur Durchführung der qPCR

Polymerasenaktivierung	PCR-Amplifikation
1 Zyklus	50 Zyklen
95 °C für 3 Min	Denaturierung: 95 °C für 30 sek
	Primeranlagerung: 56 °C für 33 sek
	Elongation: 72 °C für 30 sek

4.5 Agarose Gelelektrophorese

Die nach jeder PCR durchgeführte Agarose Gelelektrophorese orientierte sich in ihrer Durchführung an der Beschreibung durch Sambrook und Russel (2001). Die finale Agarosekonzentration betrug 2 % (Gewicht auf Volumen) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer, ver-

setzt mit Ethidiumbromid (1 µg/ml). Zur Auftragung wurden zuerst 2 µl eines 6-fach konzentrierten Auftragungspuffers mit 10 µl Probenvolumen gemischt, wovon letztlich erneut 10 µl in die Taschen des Gels aufgetragen wurden. Parallel wurden pro Lauf 5 µl des 50 bp Molekulargewichtsmarker XIII (Roche, Mannheim, Deutschland) auf dem Gel mitlaufen gelassen. Jeder Lauf wurde mit 100 V für ca. 30 Minuten durchgeführt. Nachdem Beenden wurde das Gel unter UV-Beleuchtung fotografiert.

4.6 Isolierung von ssDNA aus asymmetrischen PCR-Ansätzen mittels Capture and Release (CaR)

Zur Isolierung der DNA-Einzelstränge aus dem Produkt der asymmetrischen PCR, in welchem sich sowohl Einzel- als auch Doppelstränge befanden, wurde ein von uns neu entwickeltes Verfahren verwendet (Hamedani et al. 2015). Hierfür wurden mit Streptavidin beschichtete, superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 2,8 µm verwendet. Es wurden jeweils 200 µl der Stock-Lösung der Beads (10 mg/ml) eingesetzt und anschließend 3 x mit 1000 µl B&W-Puffer gewaschen. Dabei wurden die Beads mit einem Magneten im Reagiergefäß gehalten.

Nach Zugabe von 200 pmol des IHT1-Capture Moleküls (5'-Biotin-GTGTGGATTGC-3') in 200 µl B&W-Puffer wurde die Mixtur 30 min unter einer Schüttelfrequenz von 1300/min und 20 °C inkubiert. Die biotinylierten Capture-Moleküle verhielten sich komplementär zur Rev-Primerbindungsstelle der IHT1-Bibliothek und zeichneten somit für die Bindung von freien IHT1-ssDNA Molekülen verantwortlich.

Nach Inkubation wurde erneut 3 x mit 1000 µl B&W-Puffer gewaschen und anschließend 900 µl der gepoolten Produkte der asymmetrischen PCR zusammen mit 5M NaCl (2 µl je 90 µl PCR-Produkt) zu den Beads gegeben und weitere 30 min inkubiert. Während dieser Phase, aufgrund der hohen Konzentration an mono- und bivalenten Ionen, banden die einzelsträngigen DNA-Moleküle an die auf den Beads immobilisierten Capture-Moleküle. Nach nachfolgendem Waschen (3x 1000 µl) mit einem Ionen-armen Waschpuffer wurde nach Entfernen des Waschpuffers 20 µl hochreines Wasser hinzugegeben und die Ansätze 3 min bei 43 °C in einem Wasserbad inkubiert. Aufgrund der sehr niedrigen Ionenkonzentration als auch der erhöhten Inkubationstemperatur wurden die gefangenen

ssDNA-Moleküle während dieser Phase von den Capture-Molekülen entlassen. Entsprechend wurde der Überstand abpipettiert und enthielt nun aus der IHT1-Bibliothek isolierte DNA-Aptamere, deren Konzentration mittels UV-Spektroskopie (siehe Punkt 3.7) ermittelt wurde.

Nach dem Benutzen wurden die Beads 3x mit 1000 µl B&W-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl Aufbewahrungspuffer bei 4 °C gelagert. Dies machte es möglich, dass weitere Einzelstrangtrennungen mit demselben Pool an Beads durchgeführt werden konnten. Dies sparte Geld und Arbeitsschritte – andererseits sollten die jeweiligen Beads nur für ein und denselben DNA-Pool benutzt werden um Kontaminationen zu vermeiden.

4.7 Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Zur Messung von DNA-Konzentrationen wurde ein „Nanodrop-Spektrometer ND1000“ der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieses erfasste spektrophotometrisch die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 sowie 280 nm. Zur Messung wurde ein Probenvolumen von 1,5 µl auf das Messfenster aufgetragen. Der Quotient aus den 260 nm- und 280 nm-Werten gab Aufschluss über die Reinheit der DNA-Probe. Die ermittelte DNA-Konzentration (µg/ml) ergab sich aus der bei 260 nm gemessenen OD multipliziert mit dem Faktor 33.

4.8 Klonierung und Sequenzierung

4.8.1 Klonierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte des, durch die Filterbindungsanalyse identifizierten, bindungsstärksten Selektionszyklus wurden hinsichtlich der zu Grunde liegenden Einzelsequenzen und deren Bindungsaffinität analysiert.

Hierfür wurde zuerst eine TA-Klonierung mit dem Vektor p-GEM-T (Promega) angewandt. Die TA-Klonierung beruht auf der Ligation eines DNA-Doppelstranges in ein vorher linearisiertes Plasmid mit Hilfe einer DNA T4 Ligase. Als sogenannte „Sticky Ends“ (Verbindungsstellen) fungieren einzelne Thymidinnukleotid-Überhänge an den 3' Enden des Plasmids. Eine weitere Voraussetzung sind Adenine als 3'Überhang der PCR-Produkte, welche durch die Herstellung des Doppelstranges durch eine Taq DNA-Polymerase im Rahmen einer vorherigen PCR entsteht.

Zuerst musste das PCR-Produkt mit den enthaltenen Doppelsträngen aufgereinigt werden. Hierzu verwendeten wir das „High pure PCR Cleanup Microkit“ der Firma Roche. Die Elution erfolgte mit 20 µl „Elutionpuffer“, so dass ein entsprechendes Volumen an aufgereinigtem PCR-Produkt für die weiteren Versuche erhalten wurde.

Die nachfolgenden Ligationsansätze wurden nach dem folgenden Schema (Tabelle 11) angesetzt und anschließend bei 8 °C für 24 h inkubiert.

Tab. 11: Pipettierschema für die Ligationsansätze

Reagenz	Reaktionsvolumen
2x Ligationspuffer	5 µl
p-GEM-T-Vektor	1 µl
PCR-Produkt	3 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
Für die negativprobe deionisiertes Wasser bis finales Volumen von 10	

Für die Transformation des Plasmids in kompetente E. Coli-Zellen wurden jeweils 5 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenter JM109 Zellen (DH5a) auf Eis versetzt und nach Inkubation zur Erhöhung der Transformationsrate einem Hitzeschock von 42 °C für 30 sec ausgesetzt. Nach weiterer Inkubation wurde Nährmedium hinzugegeben (LB-Medium) und auf Ampicillin-haltigem Agarboden (1 µl Ampicillin/1 ml Agar) plattiert. Zur Identifikation der rekombinanten Stämme wurde X-Gal und IPTG hinzugegeben. IPTG (Lactose-derivat) wirkt als synthetischer Induktor des Lac-Operons auf dem Plasmid und führt zu einer Expressierung des Enzyms Galactosidase. Da jedoch bei erfolgreicher Insertion der Leserahmen dieses Enzyms zerstört ist, entsteht kein funktionsfähiges Enzym und das hinzugegebene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) kann nicht zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgewandelt werden. Anhand dieser „Blau-Weiß-Selektion“ konnten aufgrund der weißen Koloniefarbe rekombinante Kolonien identifiziert und für die Kolonie-PCR isoliert werden.

Um die, durch die Kolonie amplifizierte Aptamersequenz weiter zu isolieren, wurde diese durch M13 Primer flankierte-DNA-Sequenz nun durch eine sogenannte „Kolonie-PCR“ selektiv vervielfältigt.

Hierzu wurden 32 weiße Kolonien in je ein PCR-Tube mit 10 µl vorgelegtem dH₂O suspendiert und anschließend 23 µl des in Tabelle 12 dargestellten PCR-Mastermixes hinzugefügt. Zur Herstellung des Mastermixes diente das Hot-Firepol DNA-Polymerase-Kit der Firma, Solis BioDyne. Das verwendete Temperaturprofil für die Amplifikation ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 12: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes für die „Kolonie-PCR“

Reagenz	Reaktionsvolumen
10x Reaktionspuffer B	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µl
M13 Fw primer (20 pmol/µl)	1 µl
M13 Rev primer (20 pmol/µl)	1 µl
dH ₂ O	12 µl
Formamid	0,5 µl
Hot firepol® DNA Polymerase 500U	1 µl
In Wasser suspendierte Kolonie	2 µl

Tab. 13: PCR-Programm zur Durchführung der “Kolonie-PCR”

I: Aktivierung der Polymerase	II: PCR Amplifikation
1 Zyklus	25 Zyklen
95 °C für 15 Minuten	Denaturierung: 95 °C für 30 sec
	Hybridisierung: 58 °C für 30 sec
	Elongation: 72 °C für 30 sec

Anschließend wurden 5 µl (+2 µl eines Ladepuffers) einer jeden Probe auf einem 2 % Agarosegel zur Erfolgsüberprüfung aufgetrennt. Da die Länge des, durch die M13-Primer amplifizierten, Vektorstückes ca. 240 bp beträgt und die eingefügten Aptamersequenzen eine Länge von 80 bp aufwiesen, sollte sich das PCR-Produkt bei positiver Reaktion auf einer Markerhöhe von ca. 320 bp Länge befinden.

4.8.2 Sequenzierung der Klone

Zur Durchführung der im Rahmen der Sanger-Sequenzierung angewandten Kettenabbruchreaktion mit fluoreszenz-markierten dNTPs wurden die PCR-Produkte der „Kolonie-PCR“ mit dH₂O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und hiervon schließlich 2 µl zu 9 µl eines entsprechenden Mastermixes in ein PCR-Tube hinzugefügt. Zur Herstellung diente das Sequenzierungskit, Big Dye Terminator v.1.1 der Firma Applied Biosystems, Austin, TX, USA. Die Zusammensetzung dieser Sequenzier-PCR ist in Tabelle 14 aufgeführt, das verwendete Temperaturprofil in Tabelle 15.

Tab. 14: Pipettierschema zur Sequenzierungs-PCR mit ddNTPs

Reagenz	Reaktionsvolumen
RM (Readymix: Enthält ddNTP und Polymerase)	0,5 µl
5x Puffer	1,5 µl
Primer (3,2µM FW)	0,5 µl
dH ₂ O	6,5 µl
Verdünntes PCR-Produkt der vorigen PCR	2 µl

Tab. 15: PCR-Programm zur Sequenzierungs-PCR

I: Aktivierung der Polymerase	II: PCR Amplifikation
1 Zyklus	35 Zyklen
96 °C für 1 Minute	Denaturierung: 96 °C für 10 sec
	Hybridisierung: 50 °C für 5 sec
	Elongation: 60 °C für 240 sec

Nach Abschluss der Reaktion wurde eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt, um die erhaltenen Kettenabbruchprodukte aufzureinigen.

Entsprechend wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Reagenzien zu den Produkten der vorherigen Reaktion hinzugegeben.

Tab. 16: Reaktionsansatz zur Ethanol-Präzipitation

Reagenz	Reaktionsvolumen
dH ₂ O	10 µl
2M Natriumacetat (pH 4,6)	2 µl
Ethanol 95 %	50 µl

Dieser Ansatz wurde 45 min mit 4000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend 200 µl 70 %iges Ethanol hinzugefügt und ein weiteres Mal – jetzt für 10 Min – mit 4000 U/Min bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde der erste Zentrifugationsschritt für 1 Min wiederholt, wobei die PCR-Tubes umgedreht wurden und auf resorbierendem Zellstoff standen, um sämtlichen Überstand aus den Behältnissen zu entfernen. Damit der restliche Alkohol verdunsten konnte, blieben die Tubes noch weitere 15 Min in geöffnetem Zustand und bei Raumtemperatur stehen.

Abschließend wurden die so aufgereinigten und konzentrierten Kettenabbruchprodukte in 15 µl destilliertem Wasser gelöst und mittels eines 3130xl Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) analysiert.

4.9 Filterbindungsanalysen

4.9.1 Radioaktive Markierung von ssDNA-Molekülen

Im Allgemeinen sind Arbeiten mit radioaktiven Reagenzien nur in speziell ausgestatteten und abgenommenen Einrichtungen/Laboren möglich. In unserem Fall durften wir freundlicherweise das Radioaktivlabor des Kekulé-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn benutzen. Zu genaueren Angaben für die gesamte Vorbereitung und Filterbindungs-Prozedur lässt sich das Protokoll von Peter Stockley orientierend hinzuziehen (Stockley, 2009).

Die Markierung ausgewählter Oligonukleotide bzw. Oligonukleotid-Pools mit Phosphor-32-Isotopen wurde durchgeführt, um die Bindungsaffinität an das entsprechende Zielenzym, in diesem Fall APC, Plasmin bzw. Faktor XIa zu bestimmen. Durch die hohe Sensitivität dieser Technik konnten selbst kleine Mengen an gebundener DNA festgestellt werden.

Um das radioaktive ^{32}P Isotop an das 5'-Ende eines jeden Oligonuklotides zu transferieren benutzten wir die Nukleotidkinase T4. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Reaktionsansatz zur radioaktiven Markierung der ssDNA aus den jeweiligen Zyklus-Pools

Reagenz	Reaktionsvolumen
T4 Polynukleotidkinase (PNK) (10 U/ μl)	1 μl
10x T4 PNK Puffer	2 μl
^{32}P - γ -ATP (10 Ci/ μl)	0,75 μl
Pool-DNA	5 pmol
dH ₂ O	bis zu einem finalen Volumen von 20 μl

Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Volumen durch Hinzufügen von destilliertem Wasser auf 50 μl aufgefüllt. Die markierten DNA-Oligonukleotide konnten durch die Verwendung von G25-Chromatographie-Säulchen und Zentrifugation mit 3000 rpm für 2 Min von den ungebundenen ^{32}P - γ -ATP Molekülen getrennt werden.

Im letzten Schritt wurde eine 1:50 Verdünnung der nun markierten DNA-Oligonukleotide durchgeführt, so dass für sämtliche Folgeversuche eine DNA-Konzentration von 2 nM und somit reduzierter Radioaktivität zur Verfügung stand.

4.9.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um die erfolgte Markierung und die Reinheit der Proben zu überprüfen, wurden die Oligonukleotide nach durchgeführter Phosphorylierung in einem 10 %-Harnstoff-denaturierendem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die allgemeine Prozedur orientierte sich auch hier an dem bereits genannten Protokoll von Sambrook und Russel (2001). Die Gele wurden mit Hilfe eines FLA-3000 Radioluminografie-Scanners (Fujifilm, Stamford, USA) durch die Nutzung photostimulierter Lumineszenz analysiert. Der Herstellungsprozess ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Pipettierschema eines 10 %-Harnstoff-Polyacrylamid-Gel

Reagenz	Reaktionsvolumen
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	25 ml
Harnstoff	42 g (7 M Endkonzentration)
5x TBE	10 ml
10 % APS	0,6 ml
TEMED	60 μ l
dH ₂ O	Bis Endvolumen von 100 ml

10 μ l einer jeden verdünnten radioaktiv-markierten Probe wurde mit 5 μ l Auftragungspuffer verdünnt und auf ein 10 %iges, denaturierendes Polyacrylamid Urea Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt für 1 h bei 25 W und 350 V in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurde das Gel für ca. 24 h auf eine Phosphor-Abbildungsplatte gelegt und diese abschließend mit dem Radioluminografie-Scanner analysiert.

4.9.3 Filterbindungs-Assay

Die Bindungsaffinität der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde durch einen Filterbindungsassay ermittelt.

Verschiedene Zielproteinkonzentrationen von 0,1 nM bis hin zu 1000 nM wurden in Filterbindungspuffer vorbereitet und davon 24 μ l pro Well auf eine 96-Well-Platte gegeben. Daraufhin wurden 1 μ l der vorher radioaktiv markierten Oligonukleotide (1:50 in Aqua dest. verdünnt) in das jeweilige Well gegeben und anschließend für 45 Min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurde ein speziell hochresorbierendes Whatman™-Löschpapier und eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) mit einer Porengröße von 0,45 μ m für 15 Minuten in Waschpuffer getränkt und anschließend in den Filterbindungs-apparat, welcher die Membran analog zu einer Mikrotiterplatte in 96 einzelne Abschnitte aufteilt, eingebaut. Durch diesen Apparat war es möglich die Nitrozellulosemembran einem ständigen Sog auszusetzen.

Nach Anlegen des Vakuums wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette jedes Well des Apparates mit 200 μ l Waschpuffer gespült und anschließend 20 μ l des oben genannten Oligonukleotid-Protein-Mixes auf die Membran aufgetragen. Hier nach wurde weitere drei Mal

mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurden jeweils 0,8 µl der radioaktiv markierten Oligonukleotide als spätere 100 % Probe auf eine freie Fläche der Membran aufgetragen und schließlich ebenfalls die gesamte Membran für ca. 24 h auf eine Phosphor-Abbildungsplatte gelegt, wonach diese abschließend mit dem bereits beschriebenen FLA-3000 Radioluminografie-Scanner unter Nutzung photostimulierter Lumineszenz analysiert wurde.

Hierbei wurde die Bindung der markierten Oligonukleotide durch die relative Strahlungsintensität der einzelnen Wells in Relation zu der 100 %-Probe errechnet ($\text{Intens.}[Well] / \text{Intens.}[100\% \text{-Spot}]$). Anhand der Bindungsmuster wurden abschließend die Dissoziationskonstanten (K_D) anhand einer 4 Parameter-Logistikfunktion errechnet.

5. Ergebnisse

5.1 Selektion von DNA-Aptameren gegen APC

Um die Methodik der CE-SELEX zu evaluieren, wurde ein Zielprotein eingesetzt, gegen welches in der Vergangenheit bereits erfolgreich Aptamere selektiert werden konnten. Aus diesem Grunde lag das erste Augenmerk auf der Selektion von DNA-Aptameren gegen APC. Auf Grundlage einer erfolgreichen Selektion sollten nachfolgend die Selektionen gegen FXIa sowie Plasmin durchgeführt werden.

5.1.1 Aktivitätstests

Da für die Auftrennung des Proteins in der CE möglichst wenig Restmenge des Aufbewahrungspuffers der Stock-Lösung vorhanden sein sollte, musste das entsprechende Enzym zuvor mittels Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes in den Selektionspuffer B15 überführt (umgepuffert) werden. Um sicher zu stellen, dass die Enzymaktivität nach Umpuffern und Verdünnen im CE-optimierten Puffermedium B15 nicht signifikant beeinträchtigt ist, führten wir vor der eigentlichen Selektion Aktivitätstests mit einem enzymespezifischen Fluoreszenz-Substrat durch, dessen Intensität bei 360/460 nm nach Aktivierung gemessen wurde und mit einer Referenzkurve verglichen wurde.

Die Konzentration des Xigris-Stocks betrug 1 mg/ml. Für unsere Referenzkurve nahmen wir logarithmische Konzentrationen an „Xigris-Stock“ und verglichen 2 Konzentrationen unserer umgepufferten „Xigris-B15-Lösung“ mit den entsprechenden Werten.

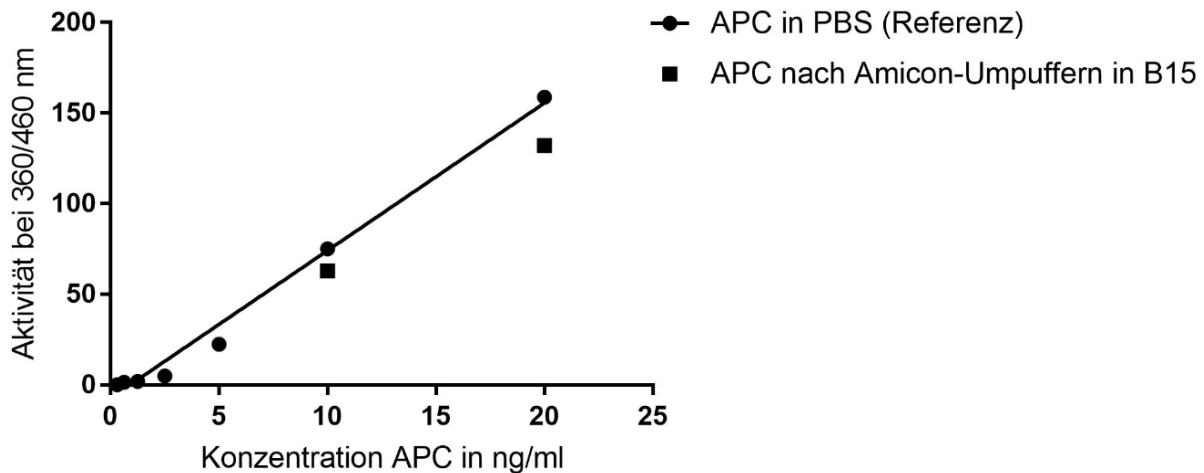


Abb. 4: Aktivitätsvergleich zwischen APC im optimalen Medium PBS, welche als Referenzkurve betrachtet wird, sowie nach Umpufferung mittels Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes in das Selektionsmedium B15. Aufgeführt sind die gemittelten Werte der initial angelegten Doppelwerte. Es ergibt sich folgende Geradengleichung der Referenzkurve: $y=7,5976x$.

In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass die Enzymaktivität im Vergleich zur Ausgangslösung nach dem Umpufferungsvorgang leicht an Aktivität verloren hat. Nimmt man die Hilfsgrößen und die sich ergebende Geradengleichung ($y=7,5976x$) zu Hilfe, ließe sich eine APC-Restaktivität von 84,83 % extrapolieren. Dies zeigte, dass eine Umpufferung durch Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes und eine anschließende Selektion im Selektionspuffer B15 ohne relevanten Aktivitätsverlust möglich war.

5.1.2 CE-Vorversuche

Mit den umgepufferten APC-Proteinen konnten nun die ersten orientierenden Versuche in der Kapillare durchgeführt werden. Hierbei konnten bei einer Proteinkonzentration von 5 μM APC ein entsprechender Peak im Elektropherogramm dargestellt werden. Die Retentionszeit von APC bis zum Detektor betrug demnach 9,2 Minuten.

Ebenso testeten wir die Durchflusszeit der DNA-Bibliothek. Diese betrug 24,5 Minuten bis zum Erreichen der maximalen Konzentration. Getestet wurde dies mit einer DNA-Konzentration von 25 μM . Dies entsprach der Startkonzentration, die später während der Selektion verwendet werden sollte.

Die entsprechenden Elektropherogramme finden sich in Abbildung 5 dargestellt.

Wichtig war, dass nicht die Durchgangszeit am PDA-Detektionsfenster der Kapillare verwendet wurde, sondern die Austrittszeit aus der Kapillaröffnung im Outlet-Auffanggefäß.

Hierzu konnte die Austrittszeit anhand der Detektionsfensterposition (50 cm nach Kapillaranfang) bzw. der Kapillargesamtlänge (60,1 cm) extrapoliert werden:

$$(\text{Zeit (sec)} \times 50 \text{ cm}^{-1}) \times 60,1 \text{ cm} = \text{Austrittszeit (sec)}$$

So konnten wir anhand der, für APC und freie DNA errechneten Retentionszeiten (Tab. 19) im Outlet-Auffanggefäß ein Selektionsfenster von 0-20 Minuten auswählen, ohne dass ein zu hohes Risiko einer Kontamination durch den nachfolgenden DNA-Pool bestand, die Protein-Aptamer-Komplexe plus dazugehörigen abdissoziierten Einzelstränge jedoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit komplett im Selektionsfenster enthalten sein würden.

Tab. 19: Retentionszeiten der relevanten Fraktionen in der Kapillare; gemessen am PDA-Fenster und Outlet-adaptiert

Fraktion in der Kapillare	Retentionszeit am PDA-Detektor	Retentionszeit im Outlet
APC 5 μM	9,2 Minuten	11,1 Minuten
IHT1-Library 25 μM	24,5 Minuten	29,4 Minuten

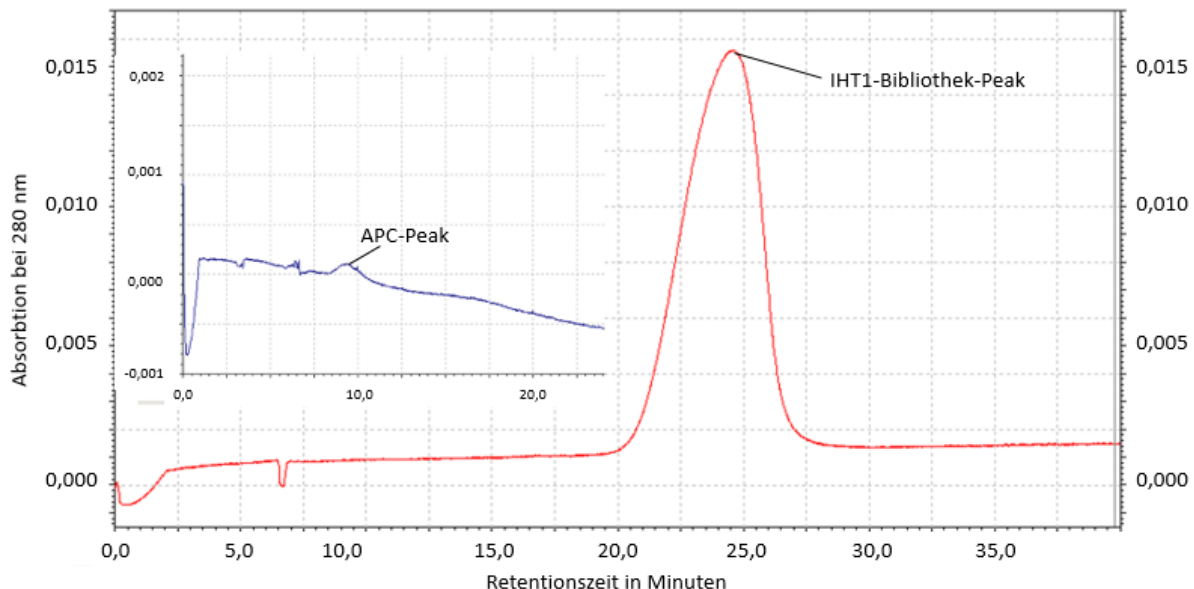


Abb. 5: PDA-Detektion/Elektropherogramm von APC und IHT1-Library in der Kapillare. Im kleinen Fenster (blauer Graph) wurde die APC-Peak mit einer Retentionszeit von 9,2 min (x-Achse) im großen Fenster (roter Graph) der IHT1-Peak mit einer Retentionszeit 24,5 min detektiert.

5.1.3 Selektionsbedingungen

Der Selektionspuffer B15 diente als Grundlage der Reagenzien im Inlet und im Inneren der Kapillare. Die eingestellte Selektionszeit betrug 20 Minuten von Minute 0 bis Minute 20. Danach stoppte der Lauf automatisch und der Inhalt der Kapillare (v.a. IHT1-Bibliothek) konnte mit dem zweimaligen reversen Waschlauf entfernt werden.

Begonnen wurde die Selektion mit einer Anfangskonzentration von 25 μM der IHT1-Bibliothek und einer Konzentration für APC von 0,5 μM . Für die restlichen Selektionsläufe wurde eine Standardkonzentration von 0,5 μM für den jeweils selektierten IHT1-Pool festgelegt, wohingegen verschiedene, von Zyklus zu Zyklus reduzierte Konzentrationen des Zielenzym eingesetzt wurden, um den Selektionsdruck kontinuierlich zu erhöhen. Jeder Zyklus begann zudem mit einem Lauf, in welchem nur der jeweilige IHT1-Pool enthalten war, welcher somit als Richtschnur (Leerwert) für die nachfolgende qPCR verwendet werden konnte. Die bei den verschiedenen Selektionszyklen verwendeten APC-Konzentrationen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tab. 20: Eingesetzte Konzentrationen für die Selektion von DNA-Aptameren gegen APC. Je weiter der Selektionsfortschritt desto breiter das eingesetzte Konzentrationsspektrum, um in der nachfolgenden Real-Time-PCR die effektivste Konzentration auswählen zu können. Zur Sicherheit betrug ab Zyklus 3 die höchste Konzentration so viel wie die niedrigste aus dem vorigen Lauf.

Zyklus	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
1	0,5 μM	-	-
2	0,1 μM	-	-
3	0,05 μM	0,1 μM	-
4	0,025 μM	0,05 μM	-
5	0,006 μM	0,012 μM	0,025 μM
6	0,003 μM	0,006 μM	0,015 μM

5.1.4 Selektionsüberprüfung anhand qPCR

Nach jedem Selektionszyklus musste der Selektionserfolg überprüft und bei unterschiedlichen eingesetzten APC-Konzentrationen zudem die Eluate mit dem größten Selektionserfolg für den nächsten Zyklus ausgewählt werden.

Dies gelang unter Einsatz einer qPCR. Hierbei konnten die verschiedenen Selektionsläufe eines Zyklus auf ihren Gehalt an ssDNA (C_t -Value; je niedriger, desto höher der ssDNA-

Gehalt in einer Probe) überprüft und mit dem Leerwert verglichen werden. Anhand der jeweiligen C_t -Differenz ergaben sich handhabbare Werte als Entscheidungsgrundlage für die weitere Vorgehensweise, wie es exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt ist.

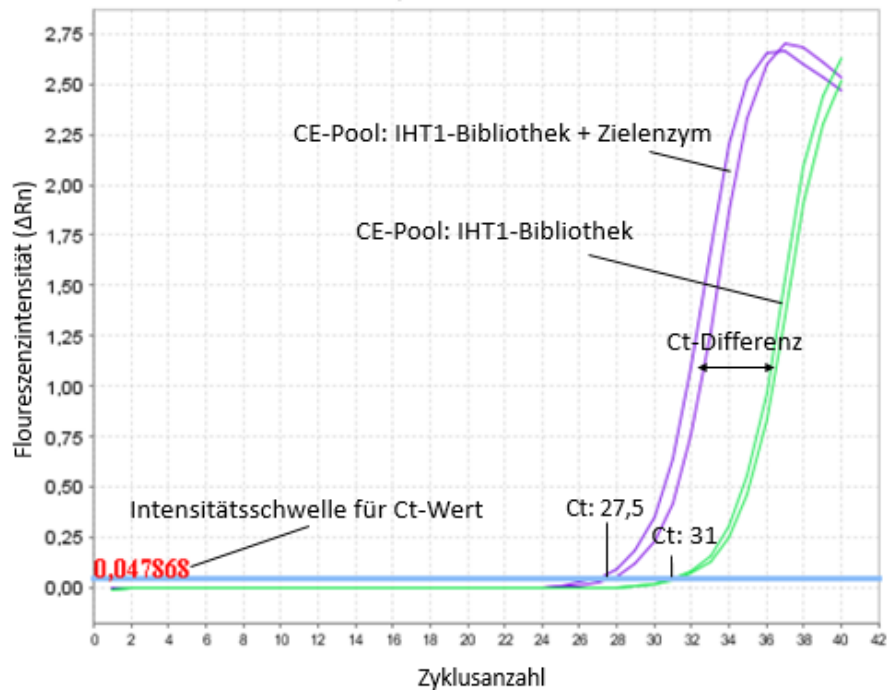


Abb. 6: Aufgezeigt sind hier exemplarisch zwei Graphen (aus Doppelwerten) der quantitativen PCR. Der grüne Graph (31 Zyklen bis zum Schnittpunkt mit der Intensitätsschwelle) spiegelt die Menge an Einzelsträngen des Leerwertes (CE-Pool mit IHT1-Bibliothek), der violette Graph (27,5 Zyklen) die Menge an Einzelsträngen des Selektionszyklus (CE-Pool mit IHT1-Bibliothek + Zielenzym) wider mit einer C_t -Differenz von 3,5 Zyklen, was einer Differenz von dem ca. 11,3-fachen an DNA-Einzelsträngen entspricht.

Als Zeichen einer erfolgreichen Selektion legten wir eine C_t -Differenz von ≥ 2 fest, was bedeutete, dass, im Vergleich zum Leerwert ohne Protein, in etwa das 4-fache an ssDNA-Molekülen mit der migrierenden Proteinfraction assoziiert war. In den Selektionszyklen, in denen verschiedene Zielenzym-Konzentrationen verwendet wurden, wurde je nach C_t -Differenz die möglichst niedrigste Konzentration als ssDNA-Pool für den nächsten Selektionszyklus ausgewählt. Die genauen Werte und Ergebnisse der qPCR sind in Tabelle 21 für die letztlich ausgewählten und somit relevanten Zielenzym-Konzentrationen dargestellt.

Tab. 21: Aufgeführt sind für jeden Zyklus der Leerwert und der Lauf, mit der, anhand der C_t -Values ausgewählten Zielprotein-Konzentration, dessen assoziierter Aptamer-Pool für den nächsten Zyklus ausgewählt wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Stringenz wurde auf die Darstellung sämtlicher C_t -Values aller Konzentrationen verzichtet und sich nur auf die relevanten beschränkt.

Zyklus	Konzentrationen	C_t -value	C_t -Differenz
1	IHT 25 μ M	25,4	4,1
	IHT 25 μ M + APC 0,5 μ M	21,3	
2	IHT 0,5 μ M	23,8	6,5
	IHT 0,5 μ M + APC 0,1 μ M	17,3	
3	IHT 0,5 μ M	25,0	5,0
	IHT 0,5 μ M + APC 0,05 μ M	20,0	
4	IHT 0,5 μ M	24,3	4,8
	IHT 0,5 μ M + APC 0,025 μ M	19,5	
5	IHT 0,5 μ M	24,7	3,5
	IHT 0,5 μ M + APC 0,012 μ M	21,2	
6	IHT 0,5 μ M	26,1	6,4
	IHT 0,5 μ M + APC 0,006 μ M	19,7	

5.1.5 Amplifikation mittels symmetrischer und asymmetrischer PCR

Zur Herstellung des ssDNA-Pools, der als Grundlage für den nächsten Selektionszyklus diente, wurde zunächst das native CE-Produkt mittels konventioneller PCR in 35 Zyklen amplifiziert. Ein wesentlicher Vorteil an diesem Zwischenschritt bestand darin, dass die so erhaltenen und gepoolten PCR-Produkte mit einem Volumen von ca. 600 μ l als Backup für die nachfolgende Generierung der DNA-Einzelstränge fungierten und auch ein mehrmaliges Fehlschlagen dieses Schrittes durch das verhältnismäßig kleine Volumen an eingesetzter dsDNA aufgefangen werden konnte.

Als nächster Schritt schlossen sich so nun 50 Zyklen einer asymmetrischen PCR an, in welcher nur der Vorwärts-Primer (FW-Primer) im Reaktionsansatz erhalten war. Dies bedingte, dass vornehmlich Stränge der gleichen Orientierung wie in der ursprünglichen DNA-Bibliothek amplifiziert wurden. Die wesentlich höhere Anzahl der Zyklen beruhte darauf, dass es sich bei dieser asymmetrischen PCR um eine vorwiegend lineare Amplifikation im Gegensatz zur exponentiellen in der konventionellen PCR handelte. Die Menge

der Matrizenstränge verblieb während der Vervielfältigung aufgrund der wesentlich niedrigeren Konzentration der an in den Reaktionsansätzen vorhandenen Rev-Primern auf einem deutlich niedrigeren Niveau.

Abschließend wurde das DNA-Produkt nach jeder PCR zur Erfolgskontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese dargestellt und untersucht. Exemplarisch ist dies für die konventionelle PCR in Abbildung 7 und für die asymmetrische PCR in Abbildung 8 dargestellt.

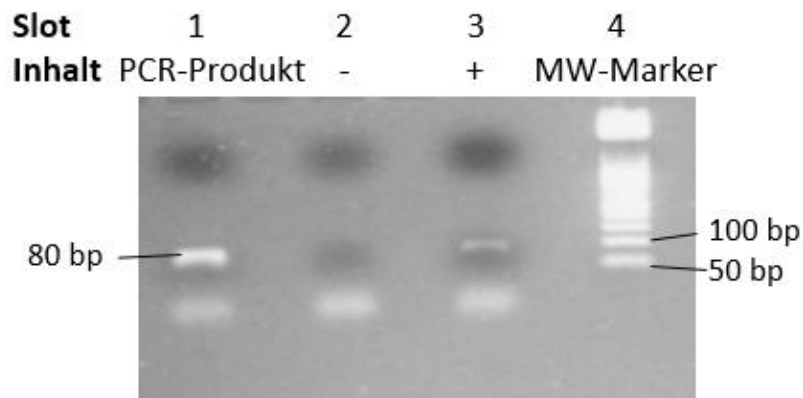


Abb. 7: Exemplarische Darstellung eines Agarosegels mit dem Produkt einer konventionellen (symmetrischen) PCR nach 35 Amplifikationszyklen. Die Bande in Slot 1 liegt im Bereich zwischen 50 und 100 Basenpaaren und zeigt den Pool an amplifizierter 80 Basenpaar langer CE-Probe. Zur Orientierung wurde zu jedem Lauf ein DNA-Molekulargewichtsmarker (Slot 4) aufgetragen und zudem eine Positiv- (10^4 IHT1-Moleküle/ μ l, Slot 3), sowie Negativkontrolle (ddH₂O, Slot 2).

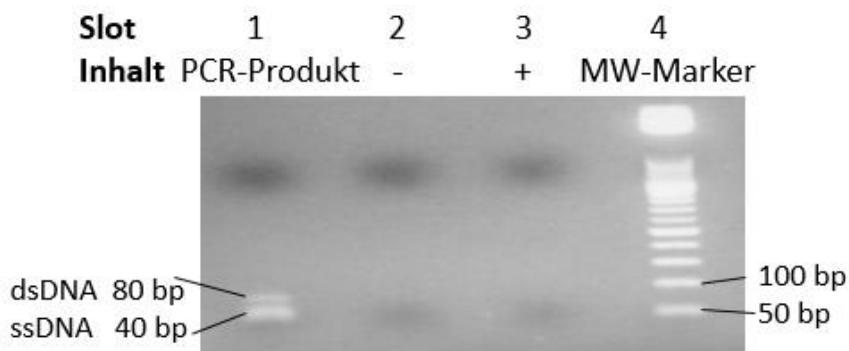


Abb. 8: Exemplarische Darstellung eines Agarosegels mit dem Produkt einer asymmetrischen PCR (nur FW-Primer enthalten). Die Doppelbande zeigt zwischen 50 und 100 Basenpaaren unten (untere Bande) den Pool an 80 Basen langen Einzelsträngen und oben (schwerere Bande) die 80 Basenpaar langen Doppelstränge der Ausgangsprobe. Auch hier wurde ein Molekulargewichtsmarker und eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet.

5.1.6 Isolation der Einzelstränge mittels „Capture and Release“

Die Isolierung der Einzelstränge von den nach wie vor im Produkt der asymmetrischen PCR enthaltenen Doppelsträngen wurde durch „Capture and Release“ (CaR, vgl. Kap 4.6) erreicht, wie Abbildung 9 exemplarisch aufzeigt.

Die Konzentration und Reinheit des isolierten ssDNA-Pools wurde anschließend durch UV-Vis-Spektroskopie mittels NanoDrop® bestimmt. Tabelle 22 zeigt für die sechs Selektionszyklen der APC-SELEX die jeweils bestimmten Werte. Die Konzentration der Isolierten ssDNA variierte von Zyklus zu Zyklus. Es konnten Konzentrationen von 1,11 μM bis 1,93 μM erreicht werden. Die Reinheit ergab sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm und war in allen Fällen recht hoch.

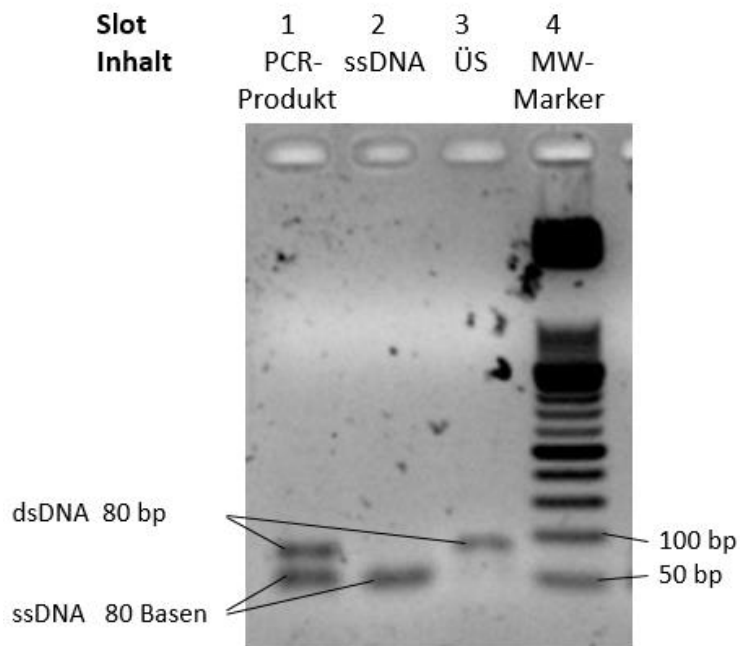


Abb. 9: Agarosegel Analyse des Ergebnisses der asymmetrischen PCR sowie nach Trennung der Einzelstränge durch CaR mittels Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads. Aufgetragen sind neben dem Molekulargewichtsmarker (Slot 4) das native PCR-Produkt (Slot 1), das durch Beads herausgetrennte reine ssDNA-Produkt (Slot 2), sowie der direkte Überstand (ÜS) des PCR-Produktes nach Inkubation mit magnetischen Beads, mit initialer dsDNA enthaltend (Slot 3).

Tab. 22: Konzentration und Reinheit der isolierten ssDNA, gemessen durch UV/Vis-Spektroskopie. Es ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm, sowie Reinheit als ihr Verhältnis und letztendlich auch die final erreichte Konzentration aufgeführt.

	Zyklus 1 0,5 μM	Zyklus 2 0,1 μM	Zyklus 3 0,05 μM	Zyklus 4 0,025 μM	Zyklus 5 0,012 μM	Zyklus 6 0,006 μM
260 nm (Abs.)	0,831	1,378	1,014	1,042	0,811	1,399
280 nm (Abs.)	0,428	0,714	0,547	0,561	0,426	0,741
260 nm / 280 nm	1,94	1,93	1,85	1,86	1,9	1,89
Endkonzentration	1,14 μM	1,9 μM	1,4 μM	1,43 μM	1,11 μM	1,93 μM

5.1.7 Filterbindungsanalysen

Die erste konkrete Überprüfung der erhaltenen ssDNA-Pools auf ihre Bindungsaffinität wurde nach Abschluss des 6. Selektionszyklus durch eine Filterbindungsanalyse durchgeführt. Die hierfür ^{32}P -radioaktiv markierten Stränge wurden mit Zielproteinkonzentrationen (hier APC) von 0,1 bis 1000 nM inkubiert und nach Waschen die Anzahl der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Stränge durch Messung der Strahlungsintensität analysiert.

Um im Vorhinein die Qualität der markierten ssDNA-Pools zu überprüfen, wurden diese in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und die Radioaktivität erfasst. Das Ergebnis dessen ist in Abbildung 10 aufgezeigt.

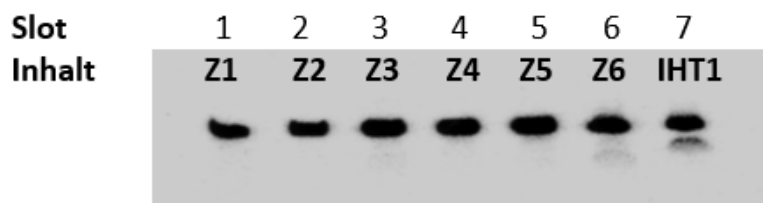


Abb. 10: Qualitätskontrolle der ^{32}P -markierten ssDNA-Stränge. Aufgetragen wurden die ssDNA-Pools der Zyklen (Z) 1-6 (Slot 1-6) und der IHT1-Ausgangspool (Slot 7). Man erkennt eine einheitliche Bandenhöhe und -stärke. Die Doppelbande des IHT1-Pools ist auf kleine artifizielle DNA-Fragmente im Ausgangspool zurückzuführen. Insgesamt zeugt dies von einer hohen Reinheit der verwendeten DNA-Pools und zudem von einer erfolgreichen Markierung.

Die daraufhin durchgeführte Filterbindungs-Analyse wurde mit den in Abbildung 11 dargestellten, radioaktiv markierten ssDNA-Pools durchgeführt. Das Ergebnis der Auslesung der Strahlungsintensitäten ist in Abbildung 12 gezeigt.

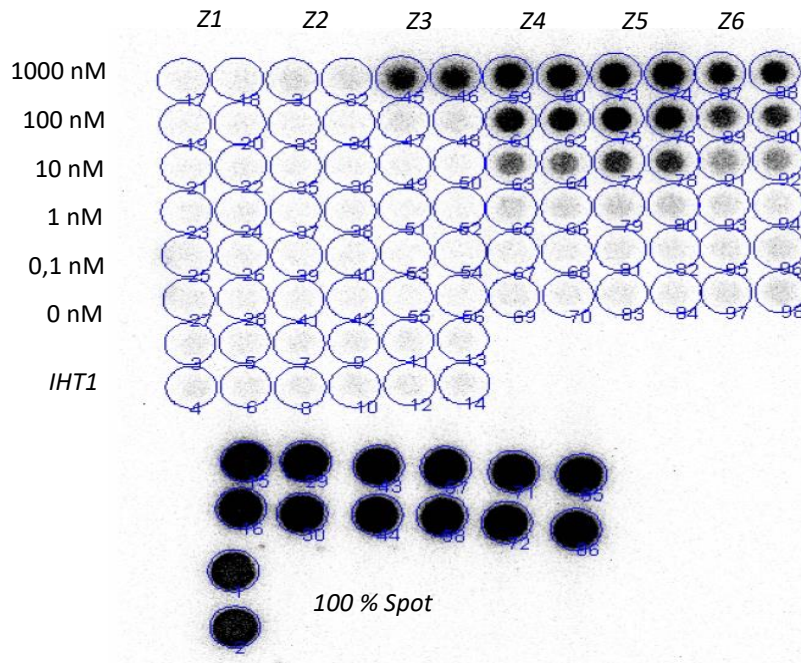


Abb. 11: APC-konzentrationsabhängige Bindung der selektierten ssDNA-Pools: Aufgetragen ist jeweils eine definierte Proteinkonzentration, die in der Randlegende beschrieben ist, sowie 2 μ l des jeweiligen radioaktiven DNA-Pools. Zur besseren Analyse besteht jede Konzentration aus Doppelwerten. Nach Inkubieren, Waschen, 24-stündiger Bestrahlung der Phosphor-Abbildungsplatte konnte diese abschließend mit einem FLA-3000 Radioluminografie-Scanner analysiert und die Stärke der Bindungsaffinität berechnet werden. Je Intensiver die Schwärzung desto stärker die Bindungsaffinität des Zyklus-Pools.

Die relative Bindung eines jeden Pools wurde in Relation zum jeweiligen 100 %-Spot (Abb. 11) für jede eingesetzte APC-Konzentration berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 12). Auf Basis dieser Daten konnte nun die Dissoziationskonstanten (K_D) berechnet werden, die diejenige Zielproteinkonzentration beschreibt, bei welcher ein Gleichgewicht zwischen der Menge an gebundenen und nicht-gebundenen ssDNA-Molekülen vorliegt.

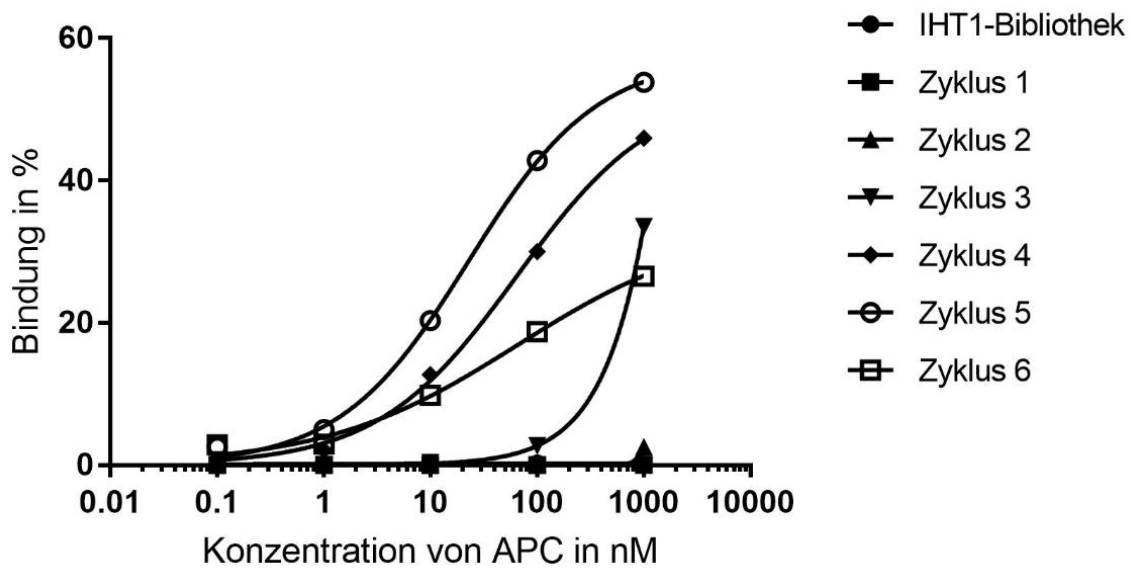


Abb. 12: Analyse der Bindungsaffinität der jeweiligen Zyklusools bei zunehmenden Zielenzymkonzentrationen. Gemessen wird hier die relative Strahlungsintensität in Relation zum jeweiligen 100 %-Spot der markierten Aptamere (s. Abb. 9). Dies zeigt indirekt die Bindung des entsprechenden Aptamerpools in Prozent an.

Es ist zu erkennen, dass die höchste relative Strahlungsintensität nach dem 5. Selektionszyklus erreicht wurde und danach wieder abnahm. Zudem zeigten sowohl die IHT1-Ausgangsbibliothek sowie die nach den Selektionszyklen 1, 2 und 3 erhaltenen ssDNA-Pools nahezu keine Affinität zum Zielprotein APC. Die ermittelten Dissoziationskonstanten der einzelnen ssDNA-Pools werden in Tabelle 23 aufgezeigt.

Tab. 23: Ermittelte Dissoziationskonstanten (K_D) der nach den verschiedenen Selektionszyklen erhaltenen ssDNA-Pools. Je niedriger die K_D , desto affiner die Bindung.

Zyklus-Pool	K_D [nM]
IHT1-Library	Nicht möglich
Zyklus 1	Nicht möglich
Zyklus 2	Nicht möglich
Zyklus 3	Nicht möglich
Zyklus 4	65,97
Zyklus 5	22,88
Zyklus 6	65,78

Da der 5. Selektionszyklus der mit der mit Abstand höchsten Bindungsaffinität war und somit als vielversprechend für weitere Analysen galt, wurden alle weiteren Experimente mit dem ssDNA-Pool des 5. und somit potentesten Selektionszyklus durchgeführt.

5.1.8 Klonierung/Sequenzierung

In einem nächsten Schritt galt es die in dem ausgewählten ssDNA-Pool (5. Zyklus) vorhandenen ssDNA-Sequenzen zu identifizieren. Dies wurde durch die Ligation von PCR-Produkten der entsprechenden symmetrischen Amplifikation in Plasmide erreicht, welche anschließend zur Transformation kompetenter E.Coli Bakterien verwendet wurden. Da jedes Bakterium nur einen einzigen Plasmidring aufnahm, konnte die erwünschte Auftrennung und Vermehrung der einzelnen, im ssDNA-Pool enthaltenen Sequenzen durch bakterielle Teilung und Koloniebildung des homogenen E.Coli-Stammes erreicht werden. Auf den beimpften Agarplatten war nach 24 h Bebrütung eine reiche (ca. 100 Stück) Kolonisierung zu sehen und es gab für die Folgeversuche ausreichend (ca. 40 Stück) „weißgefärbte“, also als erfolgreich transformiert identifizierte, Kolonien. 32 dieser transformierten Plasmide wurden für die weitere Analyse ausgewählt, wovon schließlich 19 der Inserts aus den in diesen Kolonien enthaltenen Plasmiden sequenziert werden konnten. In Tabelle 24 ist das Ergebnis der Sequenzierung dargestellt.

Tab. 24: Sequenzen der verschiedenen Kolonien des 5. Selektionszyklus. Insgesamt konnten 19 der 32 Klone zur Sequenzierung verwendet werden. Die normal gedruckten Basen stellen die fixen Sequenzen der Primer dar, welche die Aptamersequenz an 5' und 3' flankiert; die fettedruckten und unterstrichenen Basen zeigen die jeweilige Aptamersequenz. Hierbei zeigt sich eine absteigende Häufigkeitsverteilung der Sequenzen, in welcher eine Sequenz mit 77 % die häufigste ist.

Kolonie-Nr.	Sequenz
2-5,7-15,18-19 (77 %)	5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGA <u>AGCCCCGCCCTGCCTGGCACTG</u> - <u>GTTCTATGCTCCGGCAAGATT</u> TCTCTTCGAGCAATCCACAC-3'
1	5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGA <u>GCGCGGGAGGGAGATTACAGA</u> - <u>CGTGGCTGAACTGACTTAC</u> TCTCTTCGAGCAATCCACAC-3'
6 (NB-1)	5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGA <u>CACATTAGGGCGGGTACTCC</u> - <u>TATCACGTATGGGGGCCTG</u> TCTCTTCGAGCAATCCACAC-3'
16	5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGA <u>ATACTGCTAGCAGCGAACATTT</u> - <u>CGCTCCCGCGCGGTTCACAT</u> TCTCTTCGAGCAATCCACAC-3'
17	5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGA <u>AGGCCATACTTAGACTACCCCC</u> - <u>GCTATAGAGGCATCTAGCG</u> TCTCTTCGAGCAATCCACAC-3'

Diese so erhaltenen Monoklone wurden ebenfalls auf ihre Affinität zum Zielprotein APC getestet, um das potenteste Aptamer zu identifizieren. Hierzu verwendeten wir ebenfalls eine Filterbindungsanalyse, deren Auswertung in Abbildung 13 dargestellt ist.

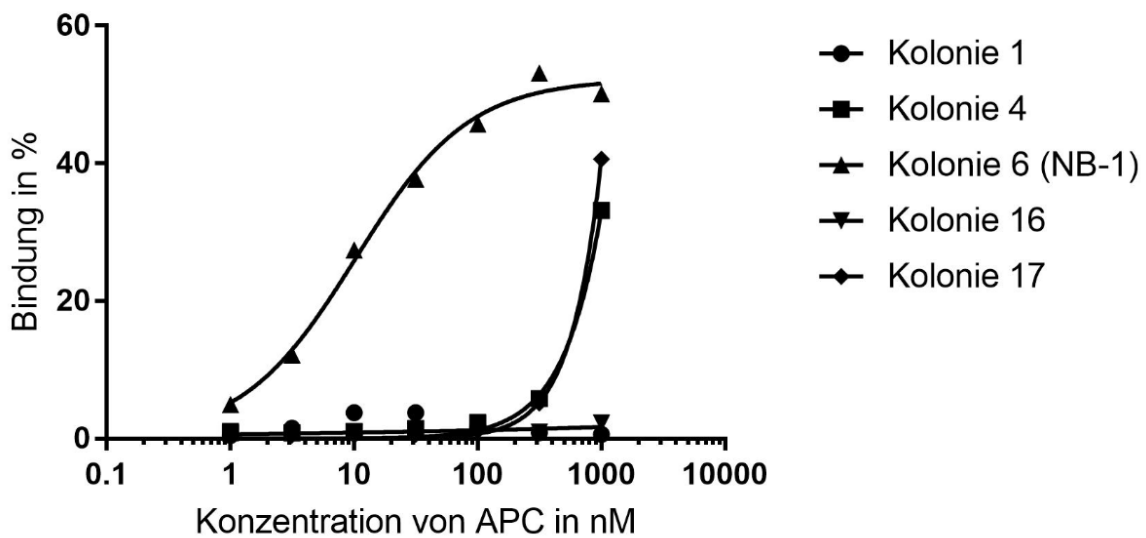


Abb. 13: Affinitätsverhalten der identifizierten Monoklone/Aptamere zum Zielenzym APC. Stellvertretend für die am häufigsten aufgetretene Sequenz wurde Kolonie 4 ausgewählt. Auffällig ist, dass die Sequenz mit dem häufigsten Vorkommen nicht gleichzeitig die höchste Bindungsaffinität besaß, sondern diese bei einer, in den ausgewählten Kolonien, einzeln auftretenden Sequenz gemessen wurde. Gemessen wurde die relative Strahlungsintensität in Relation zum jeweiligen 100 %-Spot in der Filterbindung (vgl. Abb. 9). Dies gibt indirekt die Bindung des Aptamers an das Zielenzym in Prozent an.

Da das potenteste Aptamer unserer Selektion nun konkret dargestellt werden konnte, wurde dieses praktikabilitätshalber in den Folgeexperimenten „NB-1“ genannt. Anhand der in Abbildung 13 dargestellten Bindungsdaten wurde für NB-1 eine Dissoziationskonstante (K_D) von 18 nM ermittelt.

5.1.9 Weitere Charakterisierung des Aptamers NB-1

Um das Bindungsverhalten von NB-1 in Bezug auf APC genauer zu charakterisieren und beschreiben zu können, wurde ein Folgeexperiment angeschlossen, in welchem die Differenzierungsfähigkeit zwischen der als Zielprotein fungierten aktiven Form APC und der zymogenen, inaktiven Form Protein C (PC) überprüft wurde.

Um die Diskriminierung von NB-1 zwischen aktiver und zymogener Form des Protein C zu messen, wurde wiederum ein Filterbindungsassay durchgeführt. Hierzu wurden absteigende Konzentrationen sowohl an APC als auch an PC verwendet und diese jeweils mit

einer konstanten Konzentration an ^{32}P -markierten NB-1 Aptameren inkubiert. Die Intensität der radioaktiven Strahlung wurde mittels Phosphor-Abbildungsplatte und FLA-3000 Radioluminografie-Scanner (o.g.) analysiert und ist in Abbildung 14 dargestellt.

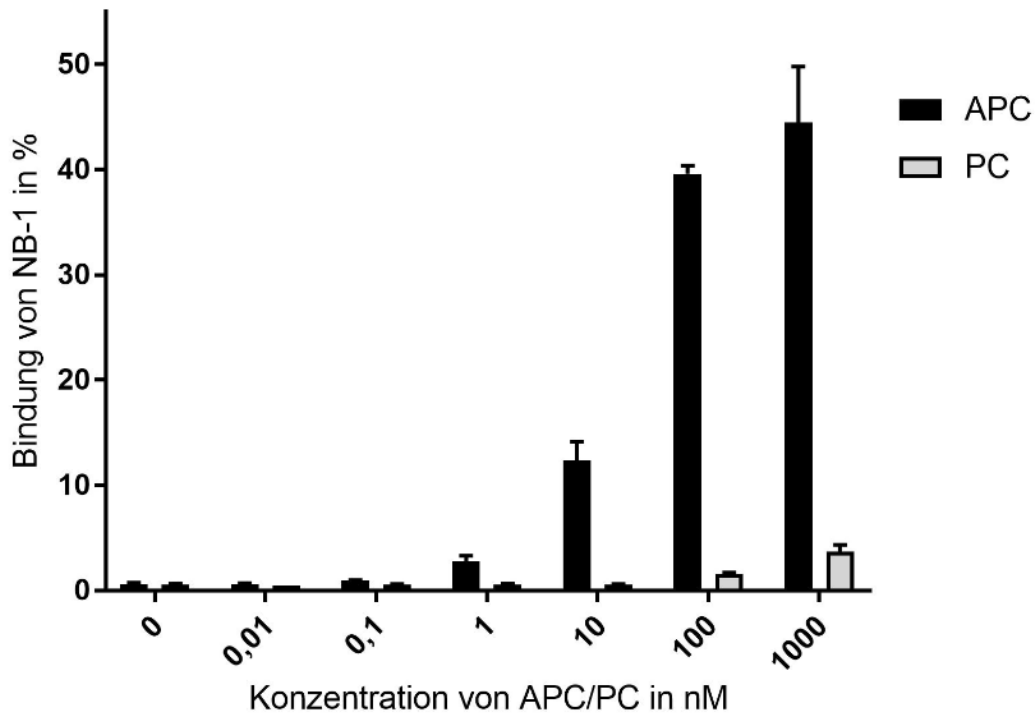


Abb. 14: Affinitätsverhalten des selektierten Aptamers NB-1 bei verschiedenen Konzentrationen von aktiver bzw. zymogener Form von Protein C. Vor allem bei hohen Konzentrationen des Zielenzym wird die Differenzierungseigenschaft des Aptamers zwischen aktivierter und inaktiver Form zu Gunsten der aktiven Form deutlich, was die jeweiligen Differenzen der Dissoziationskonstanten K_D aufzeigen.

Vor allem in den hohen Konzentrationen beider Proteine ist eine deutlich erhöhte Affinität von NB-1 zum Zielprotein APC zu erkennen. Proportional zur Konzentration steigt somit auch die Dissoziationskonstante K_D , welche ab einer Konzentration von 1 nM als signifikanter Affinitätsunterschied zu erkennen ist. Bei kleineren Konzentrationen verschwimmt die Unterscheidungsstärke.

Des Weiteren verglichen wir NB-1 mit dem bereits selektierten APC-Aptamer HS02-52G, welches 2009 von Mueller et al. mittels magnetischer Beads basierter konventioneller SELEX selektiert wurde. Verglichen wurde NB-1 mit einer Konsensussequenz, welche bereits in den verschiedenen HS02-Aptameren ein wiederkehrendes Sequenzmotiv darstellte (Müller et al. 2009):

Konsensussequenz der HS02-Aptamere: 5'-**TATCMCGNATGGGS**-3'

NB-1 mit Forward- und Reverse-Primer:

5'-AAGCAGTGGTAAGTAGGTTGACACATTAGGGCGGGGTACTCC-**TATCA-CTAGGGGGCCTGTCTCTTCGAGCAATCCACAC**-3'

Es zeigte sich, dass die zuvor beschriebene Konsensussequenz auch in dem mittels CE-SELEX identifizierten Aptamer NB-1 vorhanden ist.

Hierauf beruhend, sollte nun überprüft werden, ob man bei beiden Aptameren nun auf Grund ähnlicher Sequenzmotive auf eine ähnliche Bindungsstelle schließen kann, bzw. ob ggf. ein gegenseitiger Einfluss auf die jeweilige Bindungsstärke an das Zielprotein APC ausgeübt wird. Dazu wurde zunächst eine konstante Konzentration an APC (20 nM) 10 Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen an HS02-52G inkubiert und anschließend eine konstante Konzentration (0,5 nM) radioaktiv markiertes NB-1 als Kompetitor hinzugefügt.

Auch hier wurde nun zur Bestimmung der Bindungsstärke von NB-1 an APC eine Filterbindungs-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 aufgezeigt.

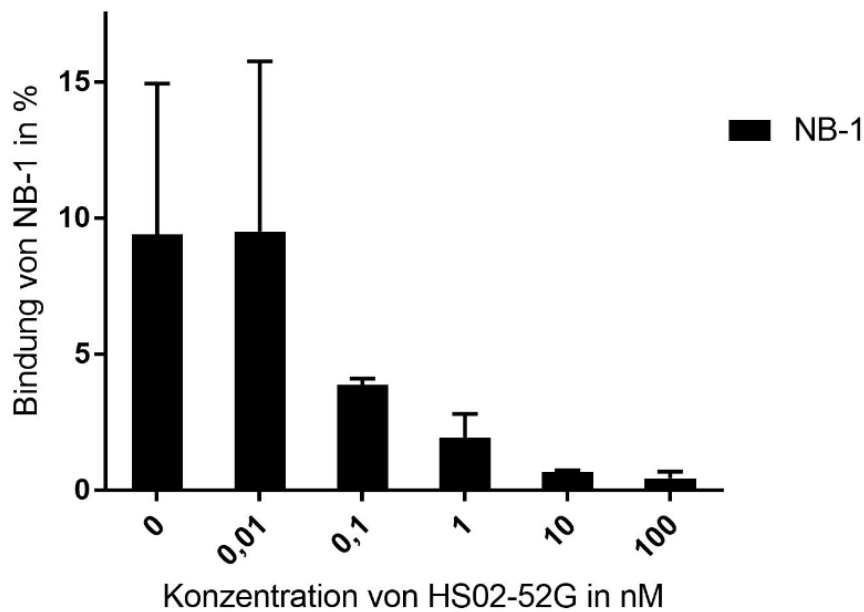


Abb. 15: Affinitätsverhalten des Aptamers NB-1 zu APC unter ansteigenden Konzentrationen des Kompetitor-Aptamers HS02-52G. Unter höheren Konzentrationen an HS02-52G ist eine Bindung von NB-1 nur noch sehr schwach darstellbar.

NB-1 zeigt somit sowohl in seiner Struktur als auch in seinem Bindungsverhalten Ähnlichkeiten mit dem bereits existierenden APC-Aptamer HS02-52G. Die mit Erhöhung der HS02-52G-Konzentration geringer werdende Bindung von NB-1 an APC, wie in Abbildung 14 dargestellt, könnte für einen Verdrängungseffekt sprechen und somit auf eine möglicherweise gemeinsame oder ähnliche Bindungsstelle schließen lassen. Eine genauere Betrachtung und Einordnung dessen erfolgt in der Diskussion (Kapitel 6).

5.2 Selektion von DNA-Aptameren gegen Plasmin

An die Evaluation der CE-SELEX-Methode mit dem, durch die Vorerfahrungen von Beginn an vielversprechenden Target-Protein APC, schloss sich mit dem Selektionsversuch von DNA-Aptameren gegen Plasmin eine Versuchsfolge mit einem in den bisherigen konventionellen SELEX-Prozeduren nicht erfolgreichem Zielmolekül an. Wegen der besonderen Rolle von Plasmin im Gerinnungssystem (Vgl. Kap. 2.3.2) und der Erweiterung des Selektionsspektrums durch CE stellte dies eine, aus vielen Gesichtspunkten betrachtet, wichtige Versuchsreihe dar.

5.2.1 Aktivitätstests

In den bisherigen Erfahrungen der Arbeitsgruppe in der Arbeit mit Plasmin hat sich gezeigt, dass Plasmin eine relativ hohe Instabilität in BSA-freien Medien hat. Aus diesem Grund war eine Aktivitätsbestimmung im Selektionsmedium B15 in hohem Maße erforderlich.

Wie bereits in den Versuchen mit APC (Vgl. Kap 5.1.1) beschrieben, führten wir vor der eigentlichen Selektion Aktivitätstests mit enzyspezifischen Fluoreszenzsubstraten durch, deren Intensität bei 360/460 nm gemessen und mit einer Referenzkurve verglichen wurde.

Es wurden verschiedene mögliche Selektionsmedien für die Plasmin-SELEX in Betracht gezogen und verglichen:

Die Referenzkurve sollte mit vermeintlich optimaler in vitro-Aktivität von Plasmin in PBS-Puffer mit Hinzunahme von 0,1 % BSA (15 µM) gemessen und erstellt werden. BSA diene in diesem Fall als möglicher Stabilisator. Ob dieser für die Selektion erforderlich und v.a. ob er hinderlich wäre, musste sich erst noch zeigen.

Als mögliche Varianten zur Herstellung einer späteren Selektionsmischung wurden folgende Kombinationen in Erwägung gezogen:

- B15-Selektionspuffer mit 0,1 % BSA und Hineingabe von Plasmin-Stock pur
- B15 pur mit Hineingabe von Plasmin-Stock pur
- B15 pur und Umpufferung von Plasmin durch Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tubes (Vgl. Kap 4.1)
- B15 pur und Umpufferung von Plasmin mit Chromatographie-Säulchen

Die verbleibende Aktivität in den entsprechenden Medien bzw. nach Umpufferungsprozedur sollte im Folgenden überprüft werden. Die Ergebnisse des ersten richtungsweisenden Aktivitätstests sind in Abbildung 16 dargestellt.

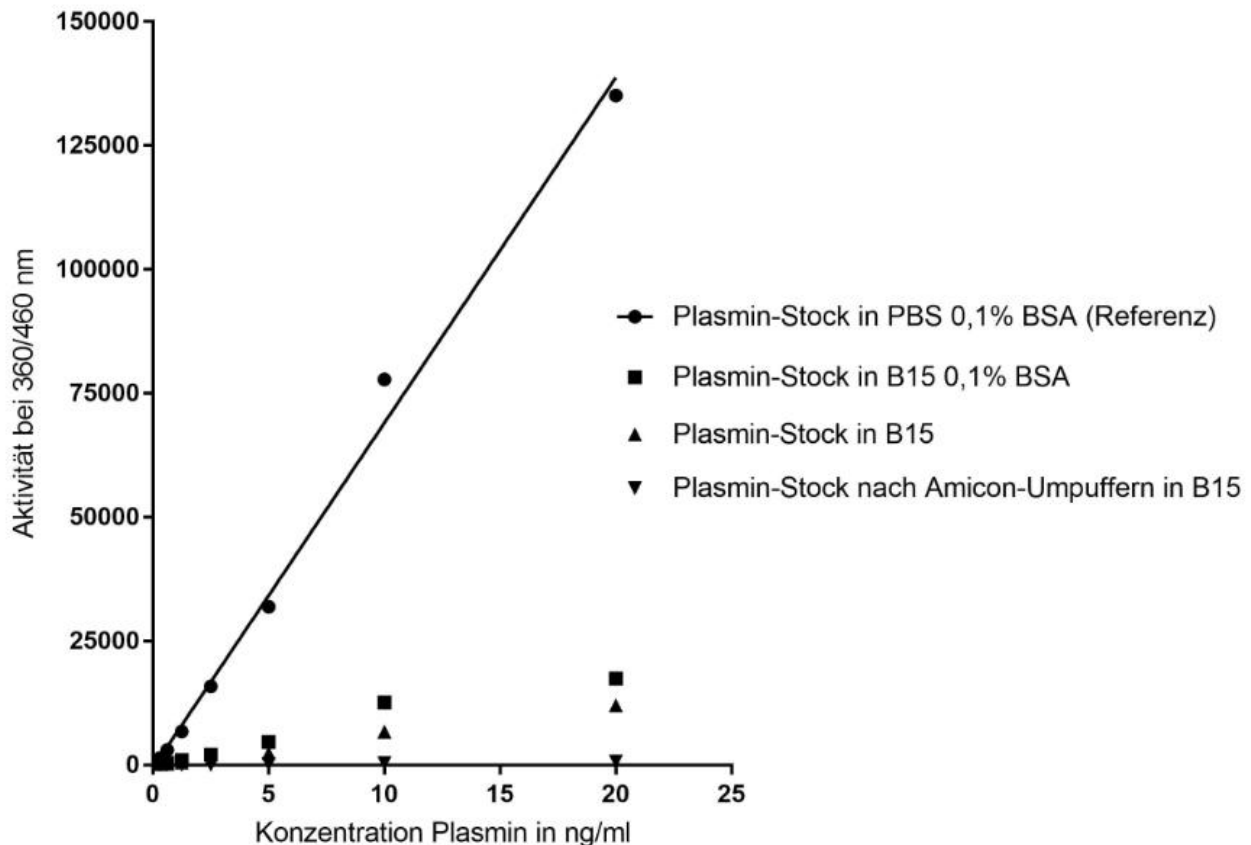


Abb. 16: Als Referenzkurvenansatz diente eine Lösung von Plasmin in PBS-Puffer mit einem BSA-Gehalt von 0,1 % (15 μ M). Durch Umrechnung in prozentuale Aktivität (Mittelung aller prozentualen Restaktivitäten der verschiedenen Konzentrationen in Bezug auf die Referenzkurve) ergeben sich 21,8 % Plasmin-Restaktivität in einem „B15 0,1 % BSA + Stock“-Ansatz, 12,8 % in einem „B15 + Stock“-Ansatz sowie 2,4 % in einem Ansatz, in welchen Plasmin mittels Amicon-Ultra-Zentrifugier-Tube in B15 umgepuffert wurde.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Umpufferung, die für APC gut geklappt hatte, für Plasmin keine Option darstellt, da die Zentrifugationsprozedur möglicherweise durch die enorme Kraffteinwirkung auf das Protein doch einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust bedingt. Als weitere Alternative dazu wurde, wie oben bereits erwähnt, die Umpufferung mittels Micro-Spin-Chromatographie-Säulchen vorgenommen und die Aktivität bestimmt. Dies zeigt jedoch einen kompletten Funktionsverlust, so dass auf eine weitere Darstellung dessen an dieser Stelle verzichtet wird. Als weiteres Ergebnis dieses Versuches lässt sich festhalten, dass die alleinige Verdünnung des Plasmin-Stocks in den Selektionspuffer B15 einen weiteren Aktivitätsverlust von ca. 40 % in Bezug auf die in „B15 0,1 % BSA“ gemessenen Aktivität mit sich bringt. In Relation zur Referenzkurve aus Abbildung 16 ergäbe sich eine noch geringere Plasmin-Restaktivität von ca. 13 %.

Somit steht fest, dass für die Selektionsläufe BSA als Stabilisator hinzugegeben werden muss, um eine zumindest noch geringgradig tolerable Plasminrestaktivität zu erreichen.

Da das Hinzunehmen von BSA nun die Anwesenheit eines weiteren Proteins im Selektionsansatz bedeuten würde, musste dieses jedoch zur Minimierung einer non-target-Selektion in einer so gering wie möglichen Konzentration verwendet werden.

In dem folgenden Versuch sollte nun gezeigt werden, dass die Plasminaktivität auch bei geringeren Konzentrationen an BSA noch ausreichend hoch ist.

Es wurden die Plasmin-Restaktivitäten einer fixen Plasminkonzentration (20 ng/ml) in Medien mit verschiedenen BSA-Konzentrationen gemessen und in Relation zu einer Referenzkurve gesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt:

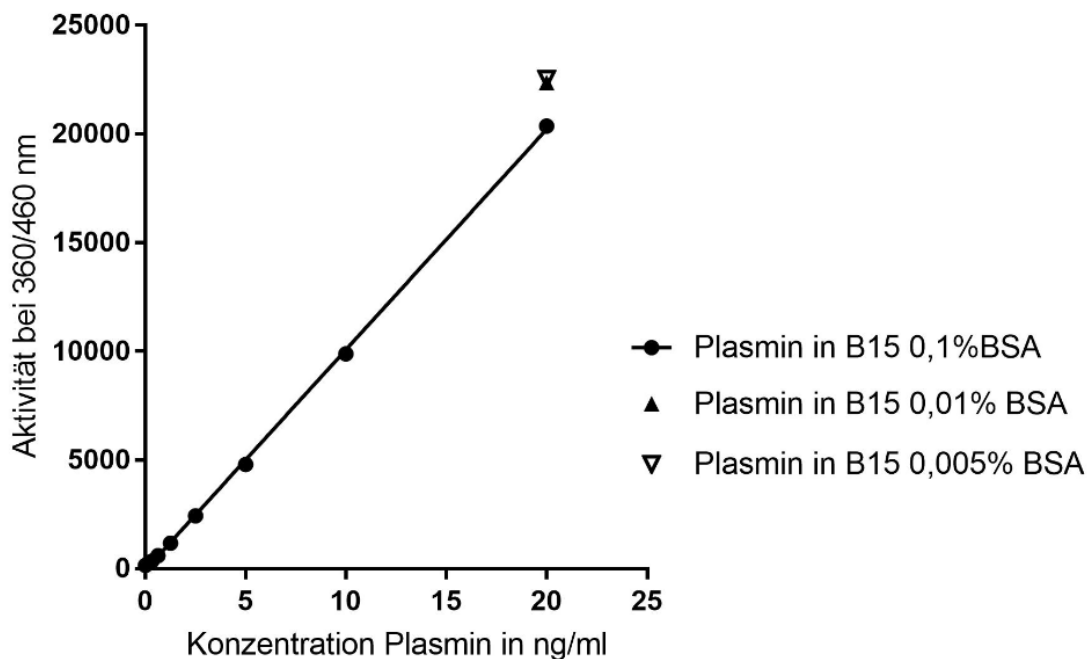


Abb. 17: Die verwendete Plasminkonzentration betrug für beide Werte 20 ng/ml. Die jeweilige Aktivität wurde mit dem entsprechenden Referenzwert verglichen, welcher in einem „B15 0,1 % BSA“-Medium gemessen wurden, da die bisher am aussagekräftigsten Messungen mit ebendiesem Medium als potentielles Selektionsmedium durchgeführt wurden. Es zeigt sich, dass die Enzymaktivität trotz erniedrigter Konzentration an BSA unverändert, in diesem Fall sogar leicht verbessert, erscheint.

Es ist anhand aller dieser Daten zu erkennen, dass die Plasmin-Enzymaktivität nahezu unabhängig von der BSA-Konzentration, jedoch stark abhängig vom Vorhandensein von BSA ist.

Die Konditionierungsläufe wurden nun anschließend auf Grundlage dieser Versuche in B15-Puffer-Ansätzen, die mit 0,005 % BSA (0,75 μM) versetzt wurden, durchgeführt.

5.2.2 CE-Vorbereitungsläufe

Da wir in diesem Ansatz durch die Instabilität von Plasmin mit BSA eine Proteinkomponente mehr in die Kapillare injizieren als in der Selektion gegen APC, musste zuerst eine Identifizierung der Retentionszeit von Plasmin in der Kapillare und anschließend eine ebensolche von BSA erfolgen.

Dadurch, dass, wie im obigen Kapitel beschrieben, Plasmin ohne Umpufferung und somit mit Glycerinanteilen (die Lagerungsflüssigkeit für Plasmin bestand aus 50 % ddH₂O und 50 % Glycerin) zum Selektionsansatz hinzugegeben wurde, befand sich in der Kapillare ein weiterer Stoffanteil, welcher, wie sich herausstellte, ebenfalls einen eigenen Peak in der PDA-Detektion hinterließ. Alle diese Einzelstoffe mussten mit geeigneten Experimenten, in welchen die einzelnen Komponenten isoliert in die Kapillare injiziert wurden, nachgewiesen werden, um die charakteristische Peakform mit der ebenfalls charakteristischen Retentionszeit im Gesamtlauf identifizieren zu können.

Zuerst testeten wir Plasmin mit einer (hohen) Konzentration von 8,55 μM . Die Konzentration wurde entsprechend hoch gewählt, um eindeutig identifizierbare Peaks erhalten zu können. So ergibt sich folgender Ansatz im Inlet der Kapillare (Tabelle 25):

Tab. 25: Inlet-Zusammensetzung des Identifizierungslaufes für Plasmin

Komponente	Volumen (Endkonzentration)
B15-Puffer	27 μl
Plasmin-Stock (85,5 μM) mit einem Volumenanteil an Glycerin von 50 %	3 μl (8,55 μM)
Finales Volumen im Inlet	30 μl

Dieser Identifizierungslauf ist in Abbildung 18 dargestellt.

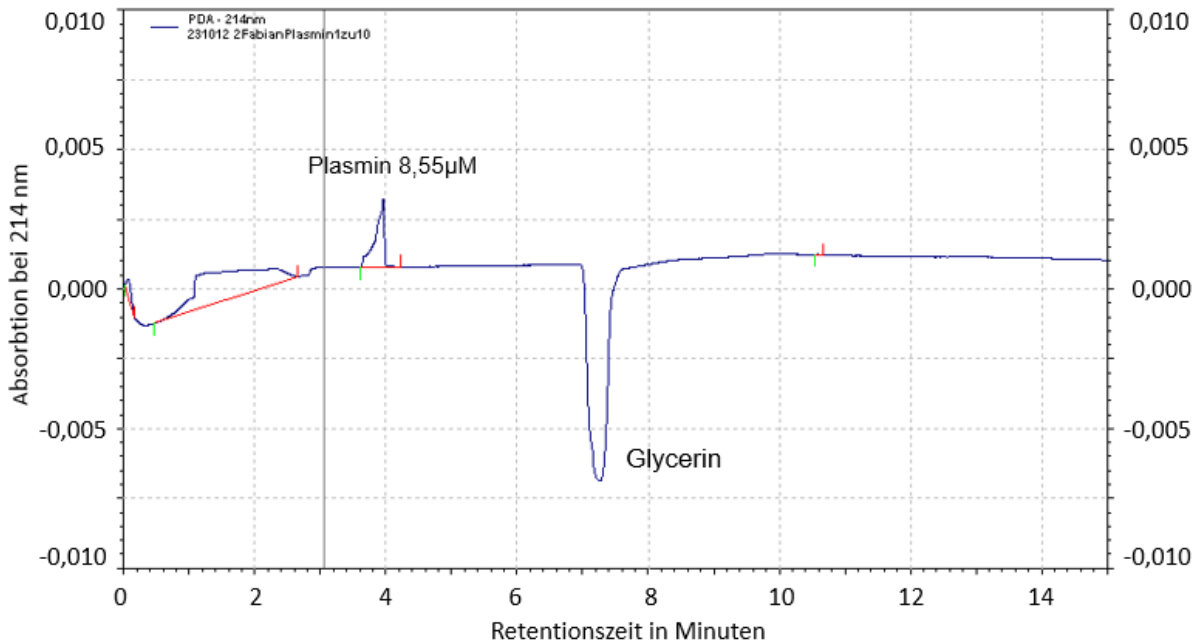


Abb. 18: Elektropherogramm der PDA-Detektion (Absorption bei 214 nm auf der y-Achse) von 8,55 µM Plasmin aus der Stock-Lösung mit enthaltenem Glycerinanteil von 50 %. Durch ein hier nicht aufgeführtes Nebenexperiment konnte der markierte Glycerinpeak eindeutig identifiziert werden. Der erste negative Ausschlag bei 2,4 Minuten wird durch die Injektion erzeugt und stellt somit ein Artefakt dar.

Als nächstes wurde zudem BSA in einer, für die Selektionsläufe vorgesehenen, Konzentration von 0,75 µM (0,005 %) hinzugefügt. Folgender Ansatz wurde in die Kapillare injiziert (Tabelle 26):

Tab. 26: Inlet-Zusammensetzung des Identifizierungslaufes für BSA in Anwesenheit von Plasmin

Komponente	Volumen (Endkonzentration)
B15-Puffer	27 µl
Plasmin-Stock (85,5 µM)	1,5 µl (4,75 µM)
BSA 0,1 %-Lösung	1,5 µl (0,005 %)
Finales Volumen im Inlet	30 µl

Abbildung 19 zeigt das entsprechende Elektropherogramm.

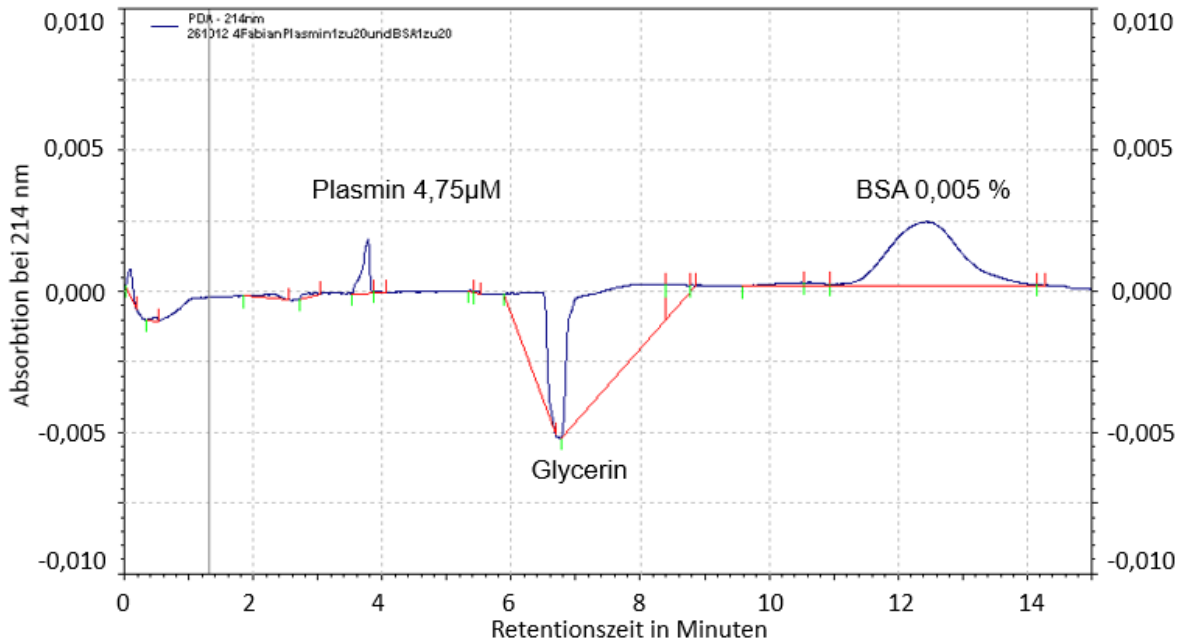


Abb. 19: Elektropherogramm der PDA-Detektion (Absorption bei 214 nm auf der y-Achse) von 4,275 µM Plasmin zusammen mit 0,005 % BSA (0,75 µM). Im Vergleich zu Abb. 16 erkennt man gut, dass die Form des jeweiligen Peaks auch unter verschiedenen Konzentrationen nahezu gleich bleibt – die Höhe und Ausprägung jedoch proportional zur Konzentration variieren.

Um die finale Komponentenzusammensetzung für die Selektionsläufe zu komplettieren, wurden abschließend noch ebenfalls 25 µM IHT1-Library hinzugefügt, deren Laufzeit alleine (wie in Kap 5.1.2 beschrieben) bei ca. 25 Minuten lag. Um die genaue Laufzeit der IHT1-Bibliothek in Kombination mit Plasmin, Glycerin und BSA zu identifizieren, wurde ein weiterer CE-Lauf durchgeführt. Der Inlet-Ansatz ist in Tabelle 27 aufgezeigt, das entsprechende Elektropherogramm findet sich in Abbildung 20.

Tab. 27: Inlet-Zusammensetzung des Identifizierungslaufes der IHT1-Bibliothek in Anwesenheit von BSA und Plasmin

Komponente	Volumen (Endkonzentration)
B15-Puffer	19,5 µl
Plasmin-Stock (85,5 µM)	1,5 µl (4,75 µM)
BSA 0,1 %-Lösung	1,5 µl (0,005 %)
IHT1-Bibliothek-Stock (100 µM)	7,5 µl (25 µM)
Finales Volumen im Inlet	30 µl

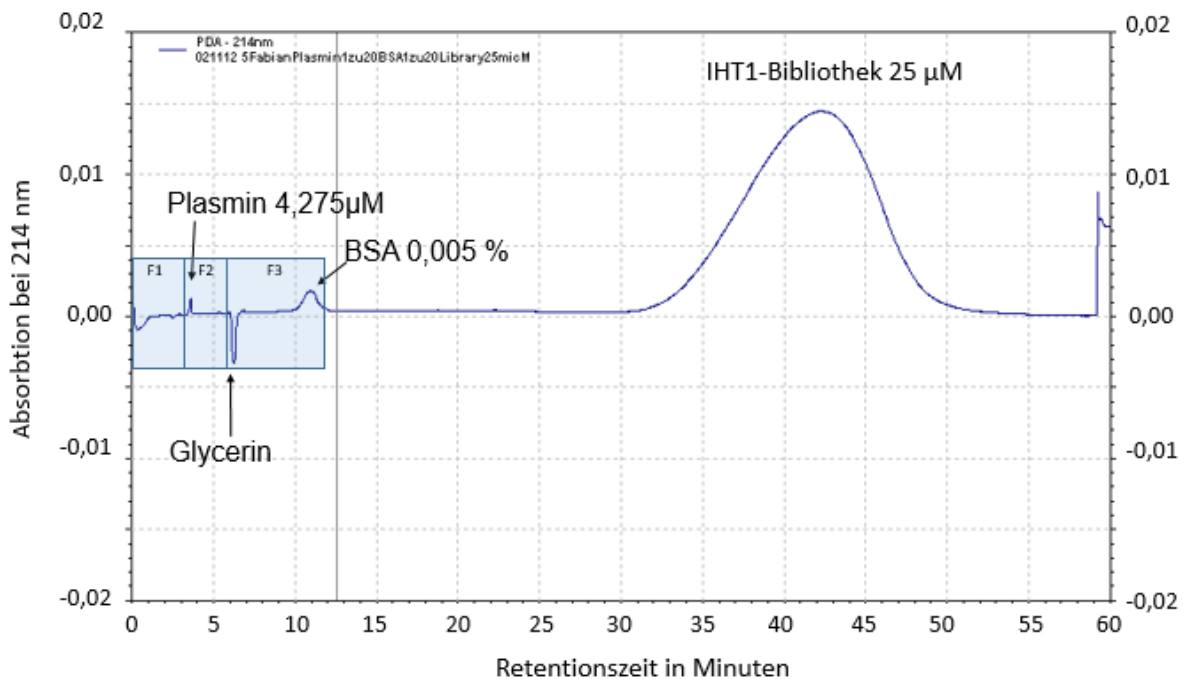


Abb. 20: Elektropherogramm der PDA-Detektion (Absorption bei 214 nm auf der y-Achse) von 4,275 µM Plasmin zusammen mit 0,75 µM BSA (0,005 %) und hinzugefügter IHT1-Bibliothek 25 µM, welche als deutlicher Peak ab Minute 30 zu identifizieren ist. In Blau hinterlegt sind graphisch die Zeitspannen der Selektions-Fractionen (F1-F3) dargestellt.

Wichtig war auch hier, dass nicht die Durchgangszeit am PDA-Detektionsfenster der Kapillare verwendet wurde, sondern die berechnete Austrittszeit aus der Kapillaröffnung im Outlet-Auffanggefäß. Hierzu konnte wiederum die Austrittszeit anhand der Detektionsfensterposition (50,5 cm nach Kapillaranfang) bzw. der Kapillargesamtlänge (60,6 cm) extrapoliert werden:

$$(\text{Zeit (sec)} \times 50,5 \text{ cm}^{-1}) \times 60,6 \text{ cm} = \text{Austrittszeit (sec)}$$

Insgesamt lassen sich, wie in Tabelle 28 aufgezeigt, anhand dieser Konditionierungsläufe und den Maßen der Kapillare folgende Retentionszeiten der einzelnen Komponenten festlegen:

Tab. 28: Retentionszeiten der relevanten Fraktionen in der Kapillare; gemessen am PDA-Fenster und Outlet-adaptiert

Fraktion in der Kapillare	Retentionszeit am PDA-Detektor	Retentionszeit im Outlet
Plasmin 4,75 μ M	3,5 Minuten	4,2 Minuten
BSA 0,005 % (0,75 μ M)	11,3 Minuten	13,56 Minuten
IHT1-Library 25 μ M	30 Minuten	36,0 Minuten

5.2.3 Aptamer-Selektion und PCR-Amplifikationen

Im direkten Vergleich zur APC-Selektion fällt in diesem Fall vor allem das Vorhandensein mehrerer wichtiger Faktoren ins Gewicht, denn sowohl Plasmin als auch die BSA-Fraktion besitzen theoretisch ein Aptamer-Selektionspotential. So ergibt sich an dieser Stelle die Schwierigkeit, den zusätzlichen, für die Plasmin-Selektion möglichen negativen BSA-Selektionsfaktor effektiv auszuschalten. Als beste und nahezu einzige Möglichkeit dies umzusetzen, erschien uns die Einteilung des Kapillaroutlets in Fraktionen mit unterschiedlichen, an die unterschiedlichen Retentionszeiten angepasste, Sammelzeiten.

Aus diesem Grunde wurden vor den Selektionsdurchgängen anhand von Zeitgrenzen drei verschiedene Fraktionen festgelegt, wie sowohl Abbildung 20 als auch Tabelle 29 zeigen.

Tab. 29: Für die Plasmin-Selektion eingestellte Fraktionsgrenzen. Aufgezeigt sind ebenfalls, die, in der Fraktion anhand der Retentionszeiten erwarteten Bestandteile. Für eine graphische Darstellung der Zeiten am PDA-Detektor s. Abb. 20.

Fraktion (Inhalt)	Selektionszeit (in Minuten) am PDA-Detektor	Selektionszeit (in Minuten) im Outlet
Fraktion 1 (leer)	0 Min \rightarrow 3,3 Min	0 Min \rightarrow 3,9 Min
Fraktion 2 (Plasmin)	3,3 Min \rightarrow 5,7 Min	3,9 Min \rightarrow 6,9 Min
Fraktion 3 (Glycerin, BSA, ggf. Beginn IHT1-Pool)	5,7 Min \rightarrow 11,7 Min	6,9 Min \rightarrow 14 Min

Die Fraktionen wurden separat aufgefangen und mittels qPCR auf ihren jeweiligen Gehalt an ssDNA untersucht. Anhand der entsprechenden Ct-Wert-Unterschiede konnte die

mögliche Mitnahme der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Aptamere in den nächsten Selektionszyklus diskutiert werden. In jedem Selektionszyklus wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an Plasmin getestet und für jede dieser Konzentrationen jeweils alle drei Fraktionen gesammelt und ausgewertet. Ein genauer Überblick der durchgeführten Plasminselektion ist in den Tabellen 30 sowie 31 dargestellt.

Tab. 30: Es sind die jeweils verwendeten Enzymkonzentrationen pro Zyklus aufgeführt. Die Konzentration, mit welcher der Pool für den nächsten Zyklus selektiert wurde, ist in diesem Falle in „fett“ gedruckt.

Zyklus	Konzentration 1	Konzentration 2
1	0,5 µM	1 µM
2	0,5 µM	1 µM
3	0,25 µM	0,5 µM
4	0,125 µM	0,25 µM
5	0,125 µM	0,25 µM
6	0,125 µM	0,25 µM

Tab. 31: Es sind die ausgewählten Fraktionen bzw. Eluate pro Zyklus aufgeführt sowie detailliert die entsprechenden und für die weitere Selektion wichtigen Parameter der qPCR.

Zyklus	Konzentrationen	Fraktion	C _t -Wert	C _t -Differenz
1	IHT 25 µM	2./3. Fraktion	28,7/28,9	1,9
	IHT 25 µM + Plasmin 1 µM	2./3. Fraktion	26,8/26,9	2,0
2	IHT 0,5 µM	2. Fraktion	29,1	2,6
	IHT 0,5 µM + Plasmin 0,5 µM	2. Fraktion	26,5	
3	IHT 0,5 µM	2. Fraktion	27,7	1,8
	IHT 0,5 µM + Plasmin 0,25 µM	2. Fraktion	25,9	
4	IHT 0,5 µM	2. Fraktion	29,6	3,5
	IHT 0,5 µM + Plasmin 0,25 µM	2. Fraktion	26,1	
5	IHT 0,5 µM	2. Fraktion	30,2	1,4
	IHT 0,5 µM + Plasmin 0,125 µM	2. Fraktion	28,8	
6	IHT 0,5 µM	2. Fraktion	28,5	2,3
	IHT 0,5 µM + Plasmin 0,125 µM	2. Fraktion	26,2	

Eine Besonderheit ergab sich nach dem ersten Zyklus: Hier hatten beide selektierten Fraktionseeluate ähnlich hohe Ct-Wert-Differenzen im Vergleich zur ersten Fraktion, so

dass hier beide Fraktionen gepoolt wurden, um nicht zu einem solch frühen Zeitpunkt die potentesten Sequenzen bereits zu verwerfen.

Wie schon für APC wurden auch hier die eingesetzten Konzentrationen an Plasmin zwecks Steigerung des Selektionsdrucks kontinuierlich gesenkt. Die zweite Fraktion, welche Plasmin enthielt, wurde nach Vergleich mit den jeweils anderen Nachbarfraktionen letztendlich in jedem Zyklus als am potentesten empfunden und für die weiteren Zyklen ausgewählt.

Zur nun folgenden Amplifikation der selektierten ssDNA wurden, wie bereits in Kapitel 5.1.5 für APC beschrieben, zunächst 35 Zyklen an konventioneller PCR durchgeführt, woraufhin das überwiegend doppelsträngige Produkt nun mittels 50 Zyklen asymmetrischer PCR in eines mit überwiegendem Anteil an Einzelsträngen überführt wurde. Dieses Produkt wurde abschließend per „Capture and Release“ aufgereinigt und die erhaltene ssDNA in den neuen Zyklus eingespeist (vgl. Kap 5.1.6).

Die Konzentration und Reinheit des jeweils isolierten ssDNA-Pools wurde stets durch die Verwendung einer UV-Vis-Spektroskopie in Form des sog. NanoDrop® bestimmt. Tabelle 32 zeigt für die sechs Zyklen der Plasmin-Selektion die mit NanoDrop® gemessenen Werte. Für weitere Ausführungen s. Kapitel 5.1.6

Tab. 32: Konzentration und Reinheit der isolierten ssDNA, gemessen durch UV/Vis-Spektroskopie.

	Zyklus 1 1 µM	Zyklus 2 0,5 µM	Zyklus 3 0,25 µM	Zyklus 4 0,25 µM	Zyklus 5 0,125 µM	Zyklus 6 0,125 µM
260 nm (Abs.)	0,746	1,072	1,567	1,303	1,23	1,673
280 nm (Abs.)	0,390	0,553	0,842	0,683	0,651	0,883
260 nm / 280 nm	1,91	1,94	1,86	1,91	1,89	1,89
Endkonzentration	1,025 µM	1,475 µM	2,15 µM	1,79 µM	1,69 µM	2,3 µM

5.2.4 Filterbindungsanalysen

Zur abschließenden Affinitätskontrolle wurde, wie bereits in Kapitel 5.1.7 beschrieben, auch bei Plasmin nach Abschluss des sechsten Selektionszyklus eine Filterbindungsanalyse durchgeführt. Die hierfür ^{32}P -radioaktiv markierten Stränge wurden mit Zielproteinkonzentrationen (hier Plasmin) von 0,1 bis 1000 nM inkubiert und nach Waschen die Anzahl der gebundenen Stränge durch Messung der Strahlungsintensität analysiert.

Abbildung 21 zeigt die Strahlungsintensität der selektierten Pools gegen Plasmin auf der Phosphor-Abbildungsplatte nach abschließender Analyse mit dem o.g. FLA-3000 Radio-luminografie-Scanner.

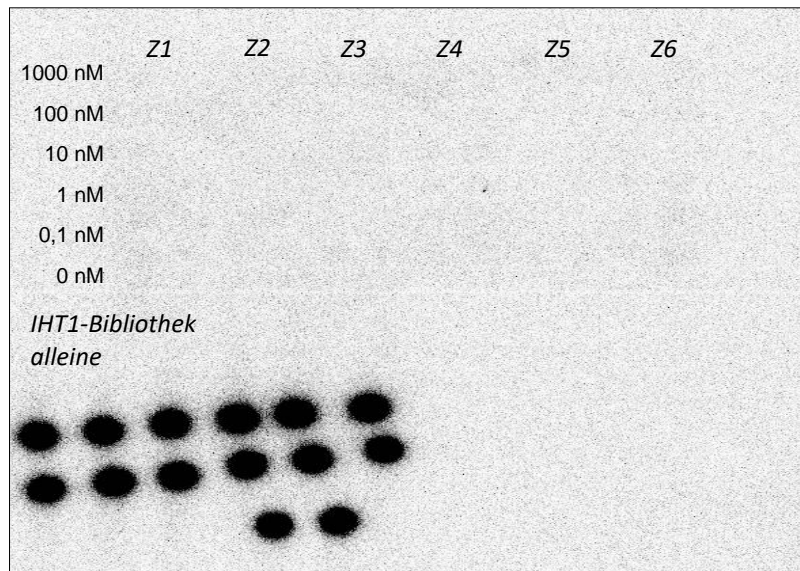


Abb. 21: Filterbindungsanalyse der einzelnen Selektionspools (Z1-Z6) gegen Plasmin sowie des Ausgangspools IHT1-Bibliothek: Die stark fluoreszierenden Areale in der linken unteren Ecke stellen Referenzkontrollen der radioaktiv-markierten DNA eines jeden Zyklus dar, die für die Affinitätsberechnung anhand der Relation zu ebendiesem 100 %-Spot von Nöten sind.

Auch nach wiederholten Filterbindungsexperimenten ließ sich letztlich feststellen, dass keine Bindung von markierten Aptameren gegenüber Plasmin stattfindet und die Selektion somit unter den verwendeten Selektionsparametern nicht erfolgreich war. Somit erübrigten sich Folgeexperimente, die zur weiteren Charakterisierung des selektierten Aptamerpools beigetragen hätten.

5.3 Selektion von DNA-Aptameren gegen Faktor XIa

Wie bereits mit Plasmin durchgeführt, wandte sich auch die Selektion gegen aktivierten Faktor XI einem Gerinnungsenzym zu, welches in der Vergangenheit wiederholt als Targetprotein einer Aptamerselektion verwendet wurde, jedoch wie schon bei Plasmin nicht zu einer erfolgreichen Selektion führte. Somit war in diesem Fall vor allem im Hinblick auf die nicht erfolgreiche Selektion gegen Plasmin interessant, in wie weit Faktor XIa ein erfolgreicher Target darstellen kann.

5.3.1 Aktivitätstests

Auch in dieser Selektionsreihe war es zu Beginn wichtig zu ermitteln, mit welcher Restaktivität von Faktor XIa unter Selektionsbedingungen zu rechnen war. Hierzu führten wir vor der eigentlichen Selektion ebenfalls Aktivitätstests mit enzyspezifischen Fluoreszenz-Substraten durch, dessen Intensität bei 360/460 nm nach Aktivierung gemessen und mit einer Standardkurve verglichen wurde. Zuerst sollte die Grundaktivität im Selektionsmedium bestimmt werden und anschließend die Umpufferung mittels Amicon-Ultrazentrifugier-Röhrchen betrachtet werden.

Als 100 %-Aktivitätswert für diese wurde die Aktivität in PBS-Puffer gemessen und hiermit der Aktivitätswert im Selektionspuffer B15, sowie die Aktivität im Selektionspuffer B15 nach Umpufferungsvorgang mittels Amicon-Ultrazentrifugation verglichen. Die Ergebnis-kurve ist in Abbildung 22 dargestellt und zeigt eine Restaktivität von FXIa in B15 gegenüber PBS-Puffer von ca. 75 % (74,8 %). Dieser Wert zeugte im Vergleich zu Plasmin von einer hohen Grundaktivität des FXIa-Stocks in B15 und bedurfte keiner Stabilisierung durch Hinzufügen von BSA oder ähnlichem. Im Gegensatz hierzu ist die Restaktivität nach Umpufferungsvorgang deutlich zurückgegangen und liegt nun bei 43,9 %.

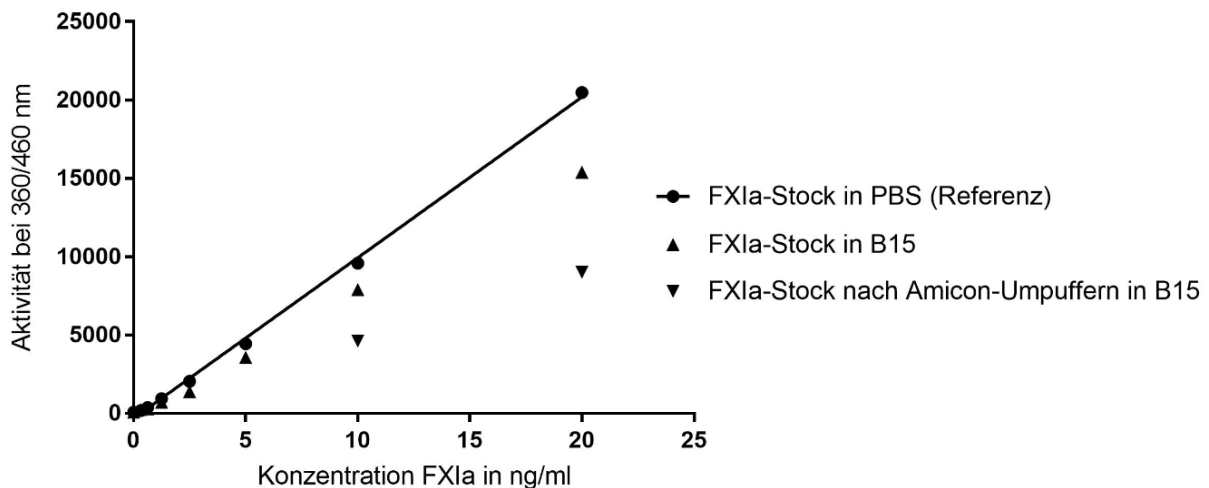


Abb. 22: Als Standardkurvenansatz diente eine Lösung von aktiviertem Faktor XI in PBS-Puffer. Durch Umrechnung in prozentuale Aktivität (Mittelung aller prozentualen Aktivitäten der verschiedenen Konzentrationen) ergeben sich 74,9 % FXIa-Aktivität in der Pufferlösung B15 sowie eine Aktivität von 43,8 % von FXIa in B15 nach Amicon-Ultrazentrifugation.

Es wird deutlich, dass die Aktivität der Proteine merklich unter der Umpufferung durch Amicon-Röhrchen leidet. Aus diesen Gründen und auf Grundlage des mangelnden Selektionserfolges bei niedriger Enzymaktivität im Selektionspuffer B15, wie wir es bereits bei Plasmin beobachteten, entschieden wir uns für eine Injektion der Stocklösung, verdünnt in B15-Puffer, in die Kapillare um einen vermeintlichen Selektionsnachteil auf Grund niedriger Aktivität möglichst ausschließen zu können.

5.3.2 CE-Vorbereitungsläufe

Wie bereits in den Selektionen vorher beschrieben, war es auch bei der Selektion gegen Faktor XIa von Nöten einen genauen zeitlichen Überblick über die Retention der verschiedenen Fraktionen zu bekommen, um ebenfalls die Sammlung der Fraktionen so anzupassen, dass eine möglichst optimale Ausbeute an potenten Aptameren resultiert.

Nachdem Plasmin bereits mit einer Konzentration von 4,3 μM deutlich vom PDA-Detektor erfasst werden konnte, veranschlagten wir bei FXIa, welches eine in etwa doppelt so große molare Masse wie Plasmin hat, eine orientierende Darstellungskonzentration von 2,2 μM FXIa, mit welcher wir die Retentionszeit bestimmen wollten. Dies führten wir direkt zu Beginn in einem Lauf mit 25 μM IHT1-DNA-Bibliothek durch. Das Resultat ist in Abbildung 23 aufgezeigt.

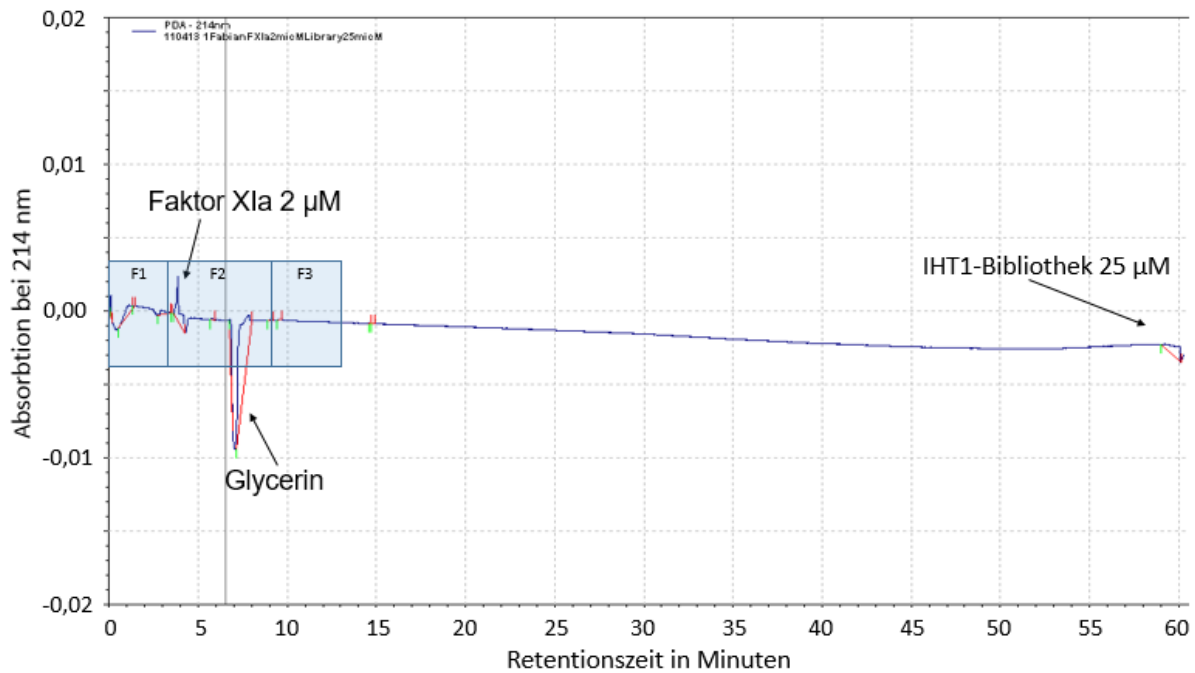


Abb. 23: Elektropherogramm der PDA-Detektion (Absorption bei 214 nm auf der y-Achse) von 2 μM FXIa aus der Stock-Lösung mit enthaltenem Glycerinanteil zusammen mit 25 μM IHT1-Library. Durch ein hier nicht aufgeführtes Nebenexperiment konnte der markierte Glycerinpeak eindeutig identifiziert werden. Der erste negative Ausschlag bei 2,4 Minuten wurde durch die Injektion erzeugt und stellt somit ein Artefakt dar. Blau transparent sind die später beschriebenen Selektions-Fractionen (F1-F3) dargestellt.

Dadurch, dass in diesem Vorversuch die IHT1-Bibliothek nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, durfte ein Folgeexperiment nicht ausbleiben, in welchem wir wiederholt die IHT1-Bibliothek alleine laufen ließen. Wie in Abbildung 24 dargestellt, verhielt sich diese im Einzellauf „normal“ und war ab einem Zeitpunkt von Minute 27 an deutlich auszumachen.

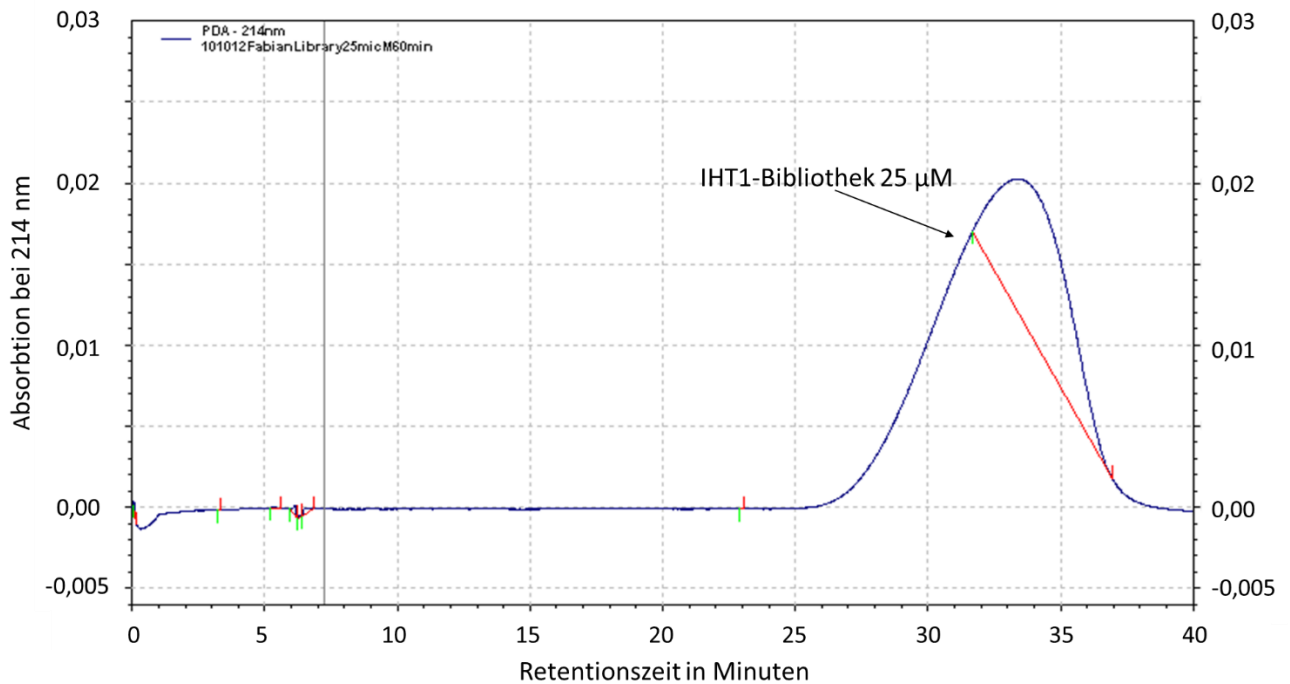


Abb. 24: Elektropherogramm der PDA-Detektion (Absorption bei 214nm auf der y-Achse) von 25 µM IHT1-Library. Die Retentionszeit beträgt hier 27 Minuten beim Peakbeginn. Der kleine negative Ausschlag bei 6,1 Minuten stellt ein Artefakt dar.

Als Retentionszeiten für die Selektion von FXIa konnten anhand der Ergebnisse aus Abbildung 23 und 24 und in Umrechnung durch die Formel der resultierenden Retentionszeit im Outlet

$$[(\text{Zeit (sec)} \times 50,2 \text{ cm}^{-1}) \times 60,4 \text{ cm} = \text{Austrittszeit (sec)}]$$

die in Tabelle 33 folgenden Retentionszeiten festgelegt werden:

Tab. 33: Retentionszeiten der einzelnen Fraktionen in der Selektion gegen Faktor XIa bei einer Gesamtkapillarlänge von 60,4 cm und einem PDA-Fenster-Abstand von 10,2 cm.

Fraktion in der Kapillare	Retentionszeit am PDA-Detektor	Retentionszeit im Outlet
Faktor XIa 2,0 µM	4,9 Minuten	5,9 Minuten
IHT1-Library 25 µM (Beginn)	27,0 Minuten	32,5 Minuten

5.3.3 Aptamer-Selektion und PCRs

Im Gegensatz zur Selektion gegen Plasmin erschien die Durchführung der Faktor Xla-Selektion zum einen durch die bessere Stabilität und zum anderen auch durch das Vorhandensein von nur einer selektionspotenten Proteinfraction einfacher durchzuführen. Trotzdem entschieden wir uns auch hierbei für die Aufteilung des Kapillaroutlets in drei Fraktionen, die in Abbildung 23 graphisch dargestellt sowie in Tabelle 34 aufgeführt sind. Jedoch wurde vor allem für die Fraktion um den Proteinpeak herum ein wesentlich großzügigerer Bereich, vor allem hinter dem Peak ausgewählt, um das Selektionsfenster für dissoziierte Aptamere zu vergrößern.

Tab. 34: Für die Faktor Xla-Selektion eingestellte Fraktionsgrenzen. Aufgezeigt sind ebenfalls die in der Fraktion anhand der Retentionszeiten erwarteten Bestandteile. Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 23.

Fraktion (Inhalt)	Selektionszeit (in Minuten) am PDA-Detektor	Selektionszeit (in Minuten) im Outlet
Fraktion 1 (leer)	0 Min → 3,2 Min	0 Min → 3,8 Min
Fraktion 2 (Faktor Xla, Glycerin)	3,2 Min → 9,0 Min	3,8 Min → 10,8 Min
Fraktion 3 (mögliche abdissoziierte Aptamere)	9,0 Min → 12,9 Min	10,8 Min → 15,6 Min

Anhand der Ergebnisse der, nach dem Selektionsdurchgang in der CE durchgeführten, qPCR wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an ssDNA analysiert und direkt miteinander verglichen. Hierfür wurde wiederum stets ein erster Lauf mit der ssDNA-IHT1 als einzigem Bestandteil durchgeführt, um einen Leerwert zu generieren. Anschließend wurden die vorher ausgewählten Proteinkonzentrationen eingesetzt und die jeweiligen Fraktionen von Leerwert und Proteinlauf direkt miteinander verglichen. Die Bedingungen der Selektion sind in den Tabellen 35 und 36 aufgeführt.

Tab. 35: Proteinkonzentrationen für die Selektion gegen aktivierten Faktor XI. Aufgeführt sind alle verwendeten bzw. eingesetzten Proteinkonzentrationen, wobei die jeweils für den nächsten Zyklus ausgewählte Konzentration in „fett“ dargestellt ist. Im sechsten Zyklus wurden beide Fraktionen vor der konventionellen PCR gepoolt.

Zyklus	Proteinkonzentration
1	0,5 µM / 1 µM
2	0,5 µM / 1 µM
3	0,33 µM / 1 µM
4	0,25 µM / 0,5 µM
5	0,125 µM / 0,25 µM
6	0,125 µM / 0,25 µM

Tab. 36: Inhalte der pro Zyklus selektierten Fraktionen sowie die entsprechenden qPCR-Ergebnisse. Pro selektierter Fraktion sind die C_T -Werte, sowie als ausschlaggebender Entscheidungswert die dazugehörige C_T -Differenz zum Leerwert in der qPCR aufgeführt.

Zyklus	Konzentrationen	Fraktion	C_T -Wert	C_T -Differenz
1	IHT 25 µM		31,8	4,8
	IHT 25 µM + FXIa 0,5 µM	2. Fraktion	27,0	
	IHT 25 µM		27,4	2,2
	IHT 25 µM + FXIa 0,5 µM	3. Fraktion	25,2	
2	IHT 0,5 µM		33,0	2,3
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,5 µM	1. Fraktion	31,7	
3	IHT 0,5 µM		34,9	9,5
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,33 µM	1. Fraktion	25,4	
	IHT 0,5 µM		29,1	6,9
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,33 µM	2. Fraktion	22,2	
4	IHT 0,5 µM		31,1	3,3
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,25 µM	2. Fraktion	28,8	
5	IHT 0,5 µM		32,3	5,6
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,125 µM	2. Fraktion	26,7	
6	IHT 0,5 µM		34,2	5,1
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,125 µM	1. Fraktion	29,1	
	IHT 0,5 µM		34,2	6,1
	IHT 0,5 µM + FXIa 0,25 µM	2. Fraktion	28,1	

In Fällen, in denen, wie im zweiten Zyklus nur die erste Fraktion ausgewählt wurde, obwohl dort, wie in Tabelle 34 dargestellt, kein Protein zu erwarten war, war ausschlaggebend, dass gerade dort in der qPCR eine deutlich höhere Konzentration an ssDNA zu finden war als in den anderen Fraktionen. Ebenso war dies das Argument für den dritten Zyklus, in welchem die erste und zweite Fraktion ausgewählt und anschließend gepoolt wurde.

Zur nun folgenden Amplifikation der selektierten ssDNA wurden wie bereits in Kapitel 5.1.5 für APC beschrieben, zunächst 35 Zyklen an konventioneller PCR durchgeführt, woraufhin das überwiegend doppelsträngige Produkt nun mittels 50 Zyklen asymmetrischer PCR in eines mit überwiegendem Anteil an Einzelsträngen überführt wurde. Dieses Produkt wurde abschließend per „Capture and Release“ aufgereinigt und die erhaltene ssDNA in den neuen Zyklus eingespeist (vgl. Kapitel 5.1.6).

Die Konzentration und Reinheit des jeweils Isolierten ssDNA-Pools wurde stets durch die Verwendung einer UV-Vis-Spektroskopie in Form des sog. NanoDrop® bestimmt. Tabelle 37 zeigt für die 6 Zyklen der FaktorXla-Selektion die mit NanoDrop® gemessenen Werte. Für weitere Ausführungen s. Kapitel 5.1.6

Tab. 37: Konzentration und Reinheit der Isolierten ssDNA, gemessen durch UV/Vis-Spektroskopie. Es ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm, sowie Reinheit als ihr Verhältnis (Werte um 2,0 bedeuten ein reines Endprodukt) und letztendlich auch die final erreichte Konzentration aufgeführt.

	Zykl. 1 0,5 µM	Zykl. 2 0,5 µM	Zykl. 3 0,33 µM	Zykl. 4 0,25 µM	Zykl. 5 0,125 µM	Zykl. 6.1 0,125 µM	Zykl. 6.2 0,25 µM
260 nm (Abs.)	0,937	0,644	2,625	2,016	2,135	2,258	2,510
280 nm (Abs.)	0,470	0,345	1,401	1,085	1,134	1,177	1,303
260 nm / 280 nm	1,99	1,87	1,87	1,86	1,88	1,92	1,93
Endkonzentration	1,28 µM	0,89 µM	3,61 µM	2,77 µM	2,9 µM	3,1 µM	3,45 µM

Für den letzten Zyklus war es schließlich nicht mehr notwendig, dass eine bestimmte Fraktion ausgewählt wurde, so dass wir uns dazu entschieden, in der folgenden Filterbindung die jeweils potentesten Fraktionen beider eingesetzter FXIa-Konzentrationen zu verwenden.

5.3.4 Filterbindungsanalysen

Die Aptamer-Pools der einzelnen Zyklen mussten auch hier auf ihre jeweilige Bindungsaffinität zum eingesetzten Zielprotein Faktor XIa hin untersucht werden. Dies wurde, wie bereits in den vorherigen Selektionen abschließend durchgeführt, durch eine Filterbindungsanalyse erreicht. Hierzu wurden Zielproteinkonzentrationen (hier Faktor XIa) von 0,1 bis 1000 nM eingesetzt und nach Waschen die Menge der gebundenen Stränge durch Messung der Strahlungsintensität analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Aufgetragen ist jeweils eine definierte Proteinkonzentration, die in der Randlegende beschrieben ist, sowie 2 µl des jeweiligen radioaktiven DNA-Pools. Zur besseren Analyse besteht jede Konzentration aus Doppelwerten. Nach 24-stündiger Bestrahlung auf der Phosphor-Abbildungsplatte konnte diese abschließend mit einem FLA-3000 Radioluminografie-Scanner analysiert werden.

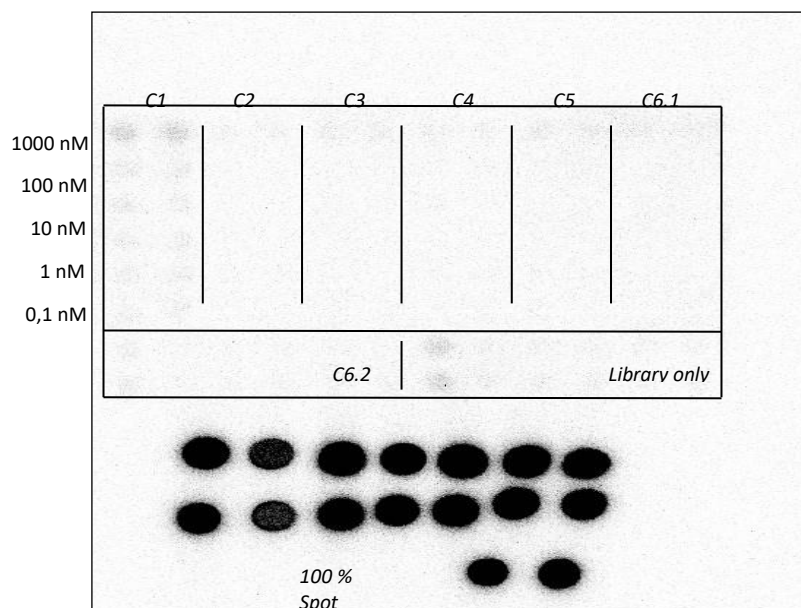


Abb. 25: Bindungsaffinitätsmessung der Selektionspools gegen Faktor XIa: Die stark fluoreszierenden Areale in der linken unteren Ecke stellen Referenzkontrollen eines jeden Zyklus dar, die für die Affinitätsberechnung anhand der Relation zu ebendiesem 100 %-Spot von Nöten sind.

Die Auswertung der Bindungsaffinitäten anhand der Filterbildung ergab nun, dass sich lediglich im ersten Zyklus eine ausgesprochen leichte Bindung der Aptamere an Faktor XIa zeigt, die jedoch in der Intensität dem Ursprungspool („Library only“) entspricht. In sämtlichen folgenden Zyklen konnte aufgrund der geringen Intensität der Strahlung von

keiner Bindung gesprochen werden. Folgeexperimente für eine Charakterisierung möglicher selektierter Aptamere waren anhand dieser Ergebnisse nicht notwendig bzw. möglich. Somit war auch bei diesem Zielenzym eine erfolgreiche Selektion durch das durchgeführte Verfahren und die entsprechenden Selektionsparameter nicht zu erreichen.

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit lässt sich in drei Abschnitte gliedern, welche sich an den drei Selektionsdurchführungen orientieren. Hierbei war die zuerst durchgeführte Selektion gegen APC erfolgreich, wohingegen die Selektionen gegen Plasmin und Faktor XIa ohne Identifizierung eines potenten Aptamers verliefen.

Entsprechend ist die Diskussion aufgebaut: Zuerst wird die erfolgreiche Selektion des APC-bindenden Aptamers NB-1 in den Kontext der Literatur eingeordnet und hieraus im Anschluss eine zentrale These der Arbeit abgeleitet und vorgestellt. Vor diesem Hintergrund folgt im weiteren Verlauf eine ausführliche und kritische Beleuchtung der Selektionen gegen Plasmin und Faktor XIa sowie eine Betrachtung möglicher Schwachstellen der durchgeführten Experimente.

Betrachtet man die durchgeführte Selektion gegen APC, so bestätigt sich in der vorliegenden Arbeit, verglichen mit anderen Arbeiten zur Aptamers Selektion mit Hilfe des CE-SELEX-Verfahrens, einer der Hauptvorteile der Selektion durch CE: Die erfolgreiche Selektion eines potenten Aptamer-Pools nach nur wenigen Selektionszyklen.

Als hauptsächliche Referenz-Arbeiten werden im Folgenden v. a. die Arbeiten der Arbeitsgruppen Mosing et al. zu einer Selektion gegen das verwendete Zielprotein „HIV reverse Transkriptase“ (HIVRT) (Mosing et al., 2005), sowie Berezovski et al. bzgl. einer Selektion gegen Protein Farnesyltransferase (PFTase) (Berezovski et al., 2005) verglichen und als Orientierung zur Einordnung verwendet. Beide Gruppen entwickelten die Methode der CE-SELEX als Weiterentwicklung der konventionellen SELEX als weltweit eine der ersten Arbeitsgruppen. (Mendonsa und Bowser, 2004), (Berezovski und Krylov, 2002).

Mosing et al., z. B., selektierten Aptamere nach bereits vier durchgeführten Zyklen und Berezovski beschreibt sogar die Anreicherung eines potenten Aptamerpools nach nur einem Selektionszyklus.

Auch bei der Selektion gegen APC gelang uns eine Anreicherung potenter Aptamere mit einem Maximum der Bindungsaffinität nach bereits fünf Zyklen. Bezüglich der Bindungsaffinitäten der selektierten Aptamere konnten sowohl Mosing als auch Berezovski jeweils

eine Dissoziationskonstante von 0,5 nM nachweisen. Für NB-1 dagegen konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Dissoziationskonstante von 18 nM gemessen werden.

Verglichen mit dem für die weiteren Charakterisierungs-Experimente eingesetzten, im Vorfeld identifizierten APC-Aptamer HS02-52G, welches eine Dissoziationskonstante von 0,47 nM aufweist (Müller et al., 2009), zeigte sich, dass trotz der bereits geringen Dissoziationskonstante von NB-1, für APC durchaus höhere Bindungsaffinitäten erreichbar sein können. Im Gegensatz zu NB-1, wurde das erwähnte HS02-52G mittels konventioneller SELEX sowie erst nach zwölf durchgeführten Zyklen identifiziert (Müller et al., 2009).

Eines der ersten Aptamere die gegen APC selektiert wurden, konnte 1998 beschrieben werden und zeigte eine Affinität von lediglich ca. 100 nM. Im Gegensatz zu NB-1 bzw. HS02-52G handelt es sich bei diesem Aptamer um ein unmodifiziertes RNA-Aptamer. Dies stellt neben der deutlich geringeren Bindungsaffinität aufgrund einer deutlich niedrigeren Stabilität im Vergleich zu DNA-Aptameren einen weiteren Nachteil dieses Moleküls dar (Gal et al., 1998).

Betrachtet man nun die Selektionsbedingungen bzw. die Selektionsmechanismen der beiden zu Beginn beschriebenen Selektionen der genannten Arbeitsgruppen, so fallen recht schnell die unterschiedlich hohen Startkonzentrationen von Enzym sowie ssDNA-Bibliothek beim ersten Zyklus der Selektion ins Auge: Berezovski et al. starteten mit 200 pM PFTase und einer ssDNA-Konzentration von 10 µM. Mosing et al. wiederum verwendeten eine Startkonzentration des Zielenzym (HIVRT) von 500 pM und eine ssDNA-Konzentration von 2,5 mM.

Im Vergleich zu den von uns eingesetzten Startkonzentrationen von APC (0,5 µM), Plasmin (1 µM), Faktor Xla (1 µM) sowie der ssDNA-Bibliothek (25 µM), unterscheiden sich hier vor allem die in der vorstehend genannten Literatur wesentlich niedrigeren Konzentrationen des Zielenzym.

Wahrscheinlich haben beide Varianten jeweilige Vor- und Nachteile: In der von uns verwendeten Variante mit absteigenden Konzentrationen des Zielenzym, versuchten wir den Selektionsdruck von Zyklus zu Zyklus zu erhöhen. So hatte ein jeder Zyklus nicht den enorm hohen Weichenstellungscharakter, als wenn von Anfang an mit minimalsten Konzentrationen gearbeitet worden wäre. Im Zusammenspiel mit der nicht stetig eindeutigen Erfolgskontrolle der qPCR (s.u.) scheint dies bei den Gegebenheiten ohne die Möglichkeit einer wesentlich genaueren LIF-Detektion, wie sie von Mosing et al. und Berezovski et al.

verwendet wurde, ein sinnvoller Kompromiss zu sein, da die Gefahr einer „blinden Selektion“ im Vorhinein somit niedrig erschien.

Der Nachteil zeigte sich hier in der sicherlich eher schwächeren Affinitätsausbeute im Endergebnis. Bei initial eher geringen Startkonzentrationen des Zielenzym werden wahrscheinlich nur wenige Aptamere mit jedoch hauptsächlich sehr hohen Affinitäten für den nächsten Zyklus selektiert – der ssDNA-Pool ist somit von Beginn an sehr potent. Im Gegensatz hierzu ist das Risiko für das „Mitschleppen“ von schwachen Bindern in der von uns gewählten Variante zumindest in den ersten Selektionszyklen erhöht.

Diese These wird durch das Ergebnis der Charakterisierung des Aptamerpools nach dem fünften Zyklus unterstützt (vgl. Tab. 24). Hier fiel auf, dass 77 % der gewählten Kolonien dieselbe ssDNA-Sequenz besaßen, diese jedoch nur eine untergeordnete Affinität zum Zielenzym APC hatte. NB-1 wiederum wurde lediglich in einer einzeln vorkommenden Kolonie identifiziert und zeigte die mit Abstand höchste Affinität aller in diesem Zyklus selektierten ssDNA-Sequenzen.

Es folgten weitere Charakterisierungsversuche beider APC-Aptamere (NB-1 und HS02-52G). Zum einen wurden die jeweiligen Sequenzen verglichen: Hier zeigte sich das Vorhandensein des Konsensusmotivs der von Müller et al. in 2009 charakterisierten HS02-Aptamere (Müller et al., 2009), obwohl zwei jeweils im Aufbau unterschiedliche ssDNA-Bibliotheken verwendet wurden (Randomisierte Sequenz von 40 vs. 49 Basenpaaren bei unterschiedlichen Sequenzen der Primerbindungsstellen). Interessanterweise wurde diese Konsensussequenz auch im Rahmen einer dritten, wiederum mit einer anderen ssDNA-Bibliothek durchgeführten, konventionellen Selektion gegen APC identifiziert (Tolle et al., 2014).

Zum anderen wurde das Bindungsverhalten beider Aptamere in einem Kompetitionsversuch untersucht. Hier ließ sich auf eine, auf der Konsensussequenz basierende, gemeinsame und möglicherweise identische Bindungsstelle schließen, da die Bindungsintensität von NB-1 sich antiproportional zur eingesetzten Konzentration von HS02-52G verhielt. Es ist auch denkbar, dass die entsprechenden Bindungsstellen auf der Enzymoberfläche in direkter räumlicher Nähe zueinander liegen, woraufhin es zu einem durch die räumliche Behinderung verursachten Verdrängungseffekt durch das potentere Aptamer, in diesem Fall HS02-52G, kommt.

Dies alles wirft die These auf, dass die Enzymstruktur den größten Einfluss auf die Struktur und sogar Basenfolge des entsprechenden Aptamers ausübt, da sich in affinen Pools ähnliche bzw. parallele Sequenzen gehäuft wiederholen.

Folglich könnte es somit für eine gezielte Optimierung der Bindungsaffinitäten gegen ein bestimmtes Protein notwendig und sinnvoll sein, eine ssDNA-Bibliothek auf Grundlage von, wenn möglich, bereits gehäuft vorgekommenen und beschriebenen Konsensussequenzen zu generieren. Dies hätte den Effekt, dass die Selektionszeit von noch hochpotenteren Aptameren um ein deutliches verringert werden könnte, wenn für ein entsprechendes Zielprotein bereits mehrere ähnliche Aptamersequenzmuster vorliegen. Auch hierzu wird diese Arbeit letztlich einen Beitrag leisten können.

Von der anderen Seite betrachtet, gibt es in der Literatur bereits genügend Anhalte dafür, dass die Auswahl des Zielproteins mit seinen jeweils spezifischen Eigenschaften auf der Proteinoberfläche bereits im Vorhinein einen maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg der Selektion hat:

Beispielsweise besitzt Thrombin die Eigenschaft, dass sich gleich zwei positiv geladene Exosites auf der Proteinoberfläche befinden, die zum einen sowohl für die Heparinbindung als auch zur Fibrinerkennung fungieren (Padmanabhan et al., 1993). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass selektierte Thrombin-Aptamere, wie z.B. „HD-1“ speziell an Exosite 1 (Bock et al., 1992) oder „60.29“ spezifisch an Exosite 2 (Tasset et al., 1997) binden. Somit hat Thrombin alleine schon auf Grund der Oberflächenstruktur bzw. Ladungsverteilung einen nicht von der Hand zu weisenden Selektionsvorteil für Aptamere, bestehend aus negativ-geladener ssDNA, bzw. ssRNA.

In unserem Fall wählten wir mit APC ebenfalls ein Zielenzym aus, welches durch seine Heparinbindungsstelle (HBS) auf der Oberfläche mindestens eine Exosite mit überwiegend basischen Aminosäuren besaß (Dahlbäck et al., 2005). Die Existenz einer HBS auf einem Protein geht mit einer vermutlich höheren Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Aptamerselektion einher. So findet sich diese Aptamer-HBS-Bindung neben Thrombin (Jeter et al., 2004) beispielsweise ebenfalls beim VEGF-Aptamer Pegaptanib (Joon-Hwa Lee et al., 2005).

Zum anderen erschien uns APC als ein geeignetes Zielenzym zur Evaluierung der Methode bzw. der geänderten Selektionsparameter, da bereits die erfolgreiche Selektion von Aptameren im Vorfeld beschrieben wurde (Müller et al., 2009).

Aus diesem Grunde lag das erste Augenmerk auf der Selektion von DNA-Aptameren gegen APC. Auf Grundlage einer erfolgreichen Selektion sollten nachfolgend die Selektionen gegen FXIa sowie Plasmin durchgeführt werden.

Mit Plasmin wählten wir ein Enzym aus, gegen welches, wie bereits in der Einleitung beschrieben, bisher noch kein Aptamer selektiert werden konnte. Die Existenz eines entsprechenden Aptamers würde jedoch einige hochinteressante Folgeexperimente ermöglichen, da basierend auf einem möglichen Aptamer in etwa die direkte Fibrinolyseaktivität messbar wäre und nicht erst mit D-Dimeren das passive Spaltprodukt. Das große Problem bei Plasmin scheint seine allgemeine Instabilität *in vitro* zu sein, wie unsere Aktivitätsmessungen zeigten. Aus diesem Grund erschien es für uns unausweichlich dem Selektionsgemisch BSA hinzuzufügen, was wiederum die Aufteilung des Selektionsfensters in mehrere Fraktionen unumgänglich machte. Ob der ausbleibende Erfolg dieser Selektion nun an der generellen Instabilität des Proteins lag oder auf einer zu kurz gefassten Sammlung der Fraktionen, lässt sich nicht eindeutig schlussfolgern. Hierzu wäre eine erneute Selektion mit optimiertem Selektionsmodus nötig.

Die nächste Auswahl fiel nach bereits in der Vergangenheit erfolgreich durchgeführten Selektionen gegen APC sowie Thrombin unter anderem auf Grund dessen auf Faktor XIa, da es sich hier um einen weiteren Heparin-bindenden Gerinnungsfaktor handelt (Emsley et al., 2010).

Faktor XIa erwies sich zudem in puncto Stabilität während der Selektion als recht beständig, was unsere Vorversuche der Aktivitätsmessung zeigten. Im Gegensatz zu Plasmin ist somit eine Begründung der nicht erfolgreichen Selektion gegen FXIa durch eine zu geringe Stabilität/Aktivität unwahrscheinlich.

Dass eine Bindung an den dimeren Faktor XIa nun trotz zweier Heparinbindungsstellen nicht zustande kam, wirft weitere Fragen auf: Betrachtet man dieses Problem nun aus Sicht der zuvor aufgestellten These, wonach das Zielenzym den größten Einfluss auf eine mögliche entstehende Bindung hat, so könnte ein Grund unter anderem in der Konformität

der Proteinoberfläche von Faktor XIa liegen. Zieht man die 2010 veröffentlichte Ausarbeitung von Emsley et al. hinzu, so liegt eine der beiden Heparinbindungsstellen in unmittelbarer Nähe zur GPIIb-, HK- (Hochmolekularem-Kininogen) sowie Faktor IX-Bindungsstelle und die andere in relativer Nähe zur Aktivierungs-Stelle (AS) (Emsley et al., 2010). Eine orientierende Übersicht über die Anordnung der Bindungsstellen ist in Abbildung 26 dargestellt.

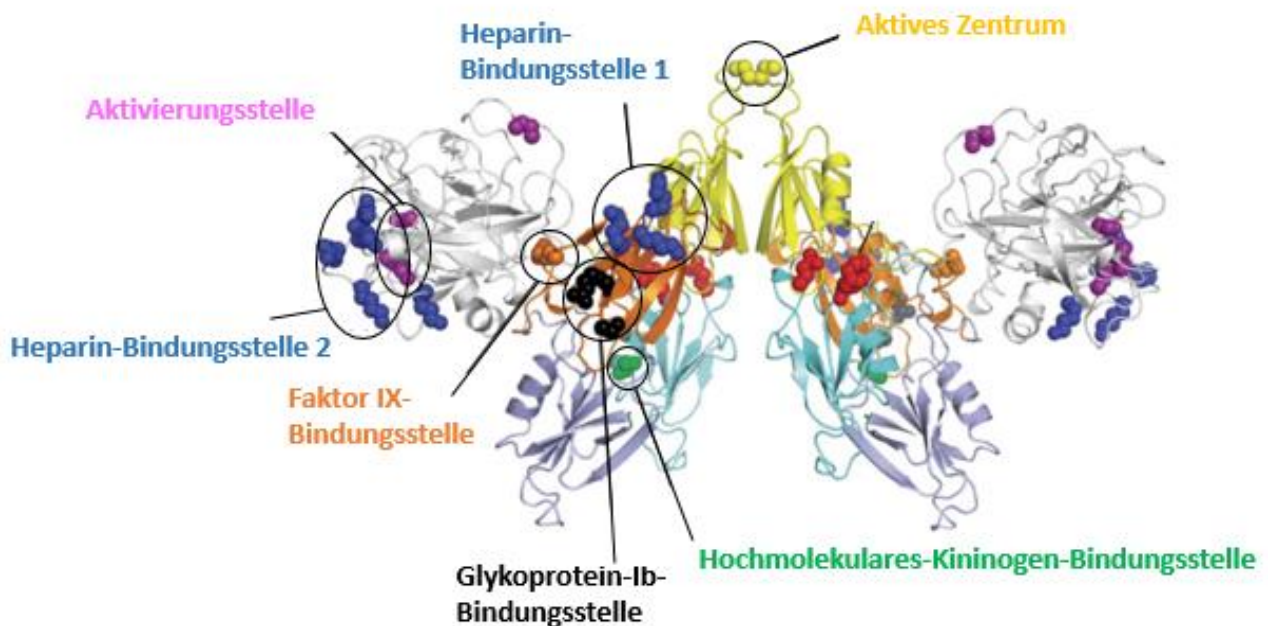


Abb. 26: Struktur der zymogenen Form von Faktor XI, dargestellt als Dimer, von welchem der Übersicht halber nur ein Monomer beschriftet ist. Die Textfarbe ist ähnlich der zu bezeichnenden Struktur. (Modifiziert nach Emsley et al., 2010).

In einer genaueren Beschreibung wird beispielsweise Glycin an der Stelle 155 als wichtige funktionelle Aminosäure der HK-Bindungsstelle genannt (Emsley et al., 2010). Als polare bzw. neutrale Aminosäure könnte Glycin möglicherweise einen, für saure ssDNA, hemmenden Einfluss auf eine Anlagerung an benachbarte Strukturen ausüben. Ebenso könnte dies für die GP1a-Bindungsstelle durch Serin an der Stelle 248 der Fall sein.

Im Gegensatz hierzu scheint mit Arginin an der Stelle 184 eine basische Aminosäure die funktionelle Aminosäure für die Faktor IX-Bindungsstelle darzustellen (Emsley et al., 2010), was in diesem Fall der oben genannten Theorie widersprechen würde.

Eine andere Möglichkeit wäre unter Umständen eine Überdeckung der Heparinbindungsstellen bei der Konformitätsänderung nach Aktivierung des zymogens Faktor XI durch Strukturen des Enzyms, was eine generelle Selektion gegen Faktor XIa deutlich erschweren würde.

Durch eine Filterbindungs-Analyse kann die entsprechende erfolgreiche Bildung von Enzym-Aptamer-Komplexen nachgewiesen werden, nachdem radioaktiv markierte ssDNA mit dem jeweiligen Zielenzym inkubiert wurde. Je nach Affinität bzw. Dissoziationskonstante ist in der Auswertung eine stärkere oder geringere Strahlung zu messen.

Nimmt man nun die, in Abbildung 27 gezeigte Reaktion als Grundlage, so gibt k_{on} in diesem Fall den Reaktionsweg zum Protein-Aptamer-Komplex hin an, k_{off} wiederum die Dissoziation der einzelnen Komponenten aus dem Komplex heraus (wobei durch k die Reaktionsgeschwindigkeit dargestellt wird).

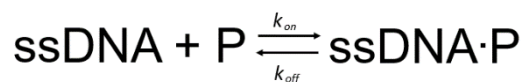


Abb. 27: Schematische Darstellung der Komplexbildung aus ssDNA und Enzym/Protein (P) in Bezug auf k_{on} und k_{off} . Zugrunde gelegt ist das Massenwirkungsgesetz. (Modifiziert nach Berzowski et al., 2005)

Die Gleichung der Dissoziationskonstanten (K_d) bei zugrunde gelegtem Massenwirkungsgesetz, ergibt sich aus dem Verhältnis von k_{off}/k_{on} (Abb. 28). Sie sagt letztlich darüber aus, auf welcher Seite der Reaktion sich das Reaktionsgleichgewicht einstellen wird.

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Abb. 28: Gleichung der Dissoziationskonstanten K_d als Quotient aus k_{off} und k_{on} . Je höher k_{on} bzw. je niedriger k_{off} desto niedriger K_d , und somit höher ist in diesem Falle die Affinität des Aptamers zum Zielenzym.

Für das eigentliche Ziel unserer Arbeit, eine Grundlage für OECA-Assays (s. Kap 2.1) gegen bestimmte Zielenzyme zu schaffen, benötigen wir prinzipiell Aptamere mit einer möglichst niedrigen K_d .

Im Rahmen von Filterbindungs-Analyse werden nur jene Aptamere erfasst werden können, welche die für diesen Zweck notwendigen Bindungseigenschaften aufweisen. Konkret wird bei der Durchführung der Filterbindung das Reaktionsgemisch aus ssDNA und dem Zielenzym nach 45-Minütiger Inkubation und anschließendem Auftragen auf eine Nitrozellulosemembran dreimal mittels 200 µl Waschpuffer gespült, was dazu führt, dass schwach affine Aptamere aus der Bindung mit dem entsprechenden Enzym förmlich „herausgespült“ werden.

Grundsätzlich sind solch schwache Aptamere für entsprechende OECA-Assays nicht geeignet, weswegen die Filterbindungs-Prozedur an dieser Stelle einen sinnvollen Selektionsdruck ausübt.

Auf der anderen Seite verhindert das effiziente „herausspülen“ potentieller Aptamere die generelle Erfolgsüberprüfung der Methode, denn auf Grundlage einer, wenn auch schlechten, nachgewiesenermaßen jedoch erfolgreichen Selektion, ließen sich möglicherweise sowohl ssDNA-Bibliothek als auch entsprechende Selektionsumstände für weitere Selektionen optimieren. Ohne auch nur den geringsten Nachweis einer Enzym-Aptamer-Bindung, ergeben sich keine konkreten Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Selektion. Es bleibt nur übrig, die gesamte Selektions-Prozedur zu hinterfragen. Alternative Methoden zur Überprüfung der Bindungsaffinität wären beispielsweise die „surface plasmon resonance spectroscopy“ (SPR) (Guo, 2012) oder die Bio-Layer Interferometry (BLI) (Concepcion et al., 2009). Beide Methoden standen uns nicht zur Verfügung. Allerdings hätte es möglich sein können sehr schwache und somit prinzipiell ungenügende Bindungen nachzuweisen.

Abseits der Enzymstruktur selbst muss jedoch auch die jeweilige Selektionsform bzw. die einzelnen Selektionsparameter, wie z. B. die Aufteilung des Selektionsfensters in Fraktionen, die Größe des Selektionsfensters, die Position des Selektionsfensters sowie unter anderem auch die verwendeten Enzymkonzentrationen während der einzelnen Zyklen kritisch hinterfragt werden.

Wir experimentierten in der vorliegenden Arbeit mit in geringem Maße verschiedenen Selektionsformen der CE-SELEX. Zum einen selektierten wir während der Selektion gegen APC mit einem einzigen großen, 20 Minuten langen Selektionsfenster, ähnlich wie es in

der Arbeit von Mosing (Mosing et al., 2005) beschrieben wurde. Hier wurden hochaffine Aptamere gegen HIV-1 Reverse Transkriptase mit einem einzigen großen, bis an den ssDNA-Peak heranreichenden Selektionsfenster selektiert. Letztlich wurden hierbei lediglich vier Zyklen benötigt. Im Gegensatz zu unserer Selektion wurde die hintere Grenze des Selektionsfensters hier jedoch „on the fly“, also flexibel während des eigentlichen Selektionsvorganges bestimmt und sollte sich jeweils 30 Sekunden vor dem Beginn des ssDNA-Peaks befinden. Hierzu konnte genutzt werden, dass sich das Detektionsfenster 10 cm vor dem Outlet der Kapillare befand. Da wir jedoch von einer konstanten Migrationszeit des ssDNA-Peaks ausgingen, hielten wir eine von Zyklus zu Zyklus flexible Bestimmung der Selektionsgrenzen für nicht notwendig, zumal es uns in der Vorüberlegung zudem auf eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Selektionszyklen ankam.

Eine etwas andere Variante verwendeten wir bei Plasmin und Faktor Xla, indem wir mit einem, in verschiedene Fraktionen aufgeteilten Selektionsfenster selektierten. Hierzu orientierten wir uns v.a. an der von Berezovski beschriebenen, sogenannten NECEEM-Theorie (Non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures) (vgl. Abb. 2). Diese befasst sich unter anderem mit der Konzentrationsverteilung und der Position der gebundenen DNA-Einzelstränge bzw. der Enzym-Aptamer-Komplexe.

Als zentraler Unterschied zu Mosing geht Berezovski in der NECEEM-Theorie anstatt von zwei Subfraktionen (im EOF spaltet sich die Ausgangsmixtur in die weiter vorne laufenden Enzym-Aptamer-Komplexe und den weiter hinten laufenden ssDNA-Pool auf) von drei in der Kapillare migrierenden Fraktionen aus, in dem er von einer separaten Enzymfraktion ohne Bindung an ein Aptamer ausgeht. Die Fraktion der Enzym-Aptamer-Komplexe befindet sich während des Kapillardurchlaufes in diesem Fall mittig zwischen Enzym- und ssDNA-Fraktion und steht mit beiden in einem stetigen Wechselfluss, da sich Enzym-Aptamer-Komplexe während der Migration teilweise auflösen und die Subkomponenten in die beiden entsprechenden umgebenden Fraktionen diffundieren. Aus diesem Grund gewinnt auch der „Zwischenraum“ zwischen den Fraktionen an Bedeutung. So werden sich zwischen den Fraktionen aus Enzym-Aptamer-Komplexen und dem ssDNA-Pool am ehesten „abdiffundierte“ Aptamere befinden, die somit höchstwahrscheinlich potentielle Affinität zum Zielenzym haben. Aus diesem Grund konzentrierte sich die Positionierung des Selektionsfensters bei Berezovski auf den Bereich, der von der Fraktion der Enzym-Aptamer-Komplexe bis kurz vor den ssDNA-Peak reicht.

Ziel der Aufteilung des Selektionsfensters in mehrere Fraktionen war es bei uns nun, gezielt die zwischen Enzym und ssDNA-Peak migrierenden Enzym-Aptamer-Komplexe aufzufangen. Vor der Positionierung der Fraktionsgrenzen ist ein direkter Nachweis der Enzym-Aptamer-Komplexe hilfreich:

In seinen aufgeführten Figuren, die exemplarisch einzelne Vorbereitungsläufe/Selektionsläufe abbilden, kann Berezovski zeigen, dass sich der initial einzeln aufgetragene Zielenzym-Peak nach Inkubation mit der ssDNA-Bibliothek im Selektionslauf um ein paar Minuten Richtung ssDNA-Peak verschoben wiederfindet, was einem direkten Nachweis/einer direkten Detektion von existierenden Enzym-Aptamer-Komplexen gleichkommt und eine Platzierung des Selektionsfensters ebendort um ein weites vereinfacht.

In einer weiteren Arbeit von Dong et. al über die Aptamerselektion gegen Alpha-Fetoprotein wird andererseits eine Konformationsänderung des entsprechenden Protein-peaks sowie eine Verkleinerung des ssDNA-Peaks nach gemeinsamer Inkubation beschrieben (Dong et al., 2015).

Hier findet sich ein großer Unterschied zu der von uns durchgeführten Selektion, bei welcher lediglich ein unempfindlicher PDA- und nicht ein sensitiver LIF-Detektor (Laser-induced fluorescence) zur Darstellung der Protein-/DNA-Migration verwendet wurde.

Die Platzierung eines geeigneten Selektionsfensters war somit bei herabgesetzter Detektion erschwert. Aus diesem Grund wurde der Großteil des Bereiches bis zum ssDNA-Peak in drei Fraktionen aufgeteilt und zunächst alle Fraktionen mittels quantitativer PCR analysiert. Die mittlere Fraktion sollte dem „positiven Selektionsfenster“ entsprechen und somit Enzym-Aptamer-Komplexe sowie vom Zielenzym dissoziierte ssDNA beinhalten.

Den Vorteil der Aufteilung des Selektionsfensters in kleine Fraktionen sahen wir letztlich darin, dass durch eine besonders kleine Selektionsfraktion die möglichst effektive und effiziente Isolation von eng mit dem Zielenzym assoziierten Einzelsträngen gelingen sollte. In einer anderen Arbeit von Ruff et al. (zu genaueren Ausführungen s. weiter unten) ist das Selektionsfenster in insgesamt sieben Fraktionen à 2 Minuten Breite aufgeteilt, was eine deutlich höhere Auflösung in der folgenden qPCR zur Folge hat. In den entsprechenden Ergebnissen konnte hier eine wesentlich konkretere Aussage zu den Mengenunterschieden an ssDNA zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Selektionslauf getroffen werden (Ruff et al., 2012).

Als eine ebenfalls große Änderung zu den erwähnten Veröffentlichungen wählten wir die hintere Grenze des Selektionsfensters in den Selektionen gegen Plasmin (bei Minute 14) und Faktor XIa (bei Minute 15:36) gezielt mit einem größeren Abstand zum ssDNA-Peak, da wir mit größerem Abstand zum Zielenzym von einer abnehmenden Grundaffinität der entsprechend anzutreffenden ssDNA zum Zielenzym ausgingen.

Mosing setzte die hintere Grenze des Selektionsfensters 30 Sekunden, Berezovski ca. 1 Minute vor dem ssDNA-Peak. Ähnlich taten wir dies in der APC-Selektion und hatten Erfolg.

Kritisch betrachtet fällt hier nun ins Auge, dass in unserem Fall Fehlselektionen ausschließlich bei denjenigen Selektionsformen auftraten, in welchen wir das Selektionsfeld in Fraktionen aufteilten – bei Plasmin und Faktor XIa. Im Gegensatz hierzu steht eine erfolgreiche Selektion bei der Verwendung des großen Selektionsfensters ohne kleine Fraktionen. Hinzu kommt, dass die hintere Grenze unseres gesamten Selektionsbereiches in einigem Abstand zum ssDNA-Peak verlief, was ebenfalls einen Unterschied zur Literatur darstellt.

Neben der nun bereits ausführlich diskutierten Selektionsform während der CE-Phase der SELEX, hatte darüber hinaus in unserem Fall die qPCR als Selektionserfolgsüberprüfung ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Selektion:

Zu Beginn der Selektionen erschien uns eine deutliche Differenz der Ct-Werte zwischen Leerwert (nur ssDNA-Bibliothek [IHT1]) und Selektionsgemisch (IHT1 + Enzym) als Hinweis auf das Zielenzym-abhängige Vorhandensein von DNA-Einzelsträngen. Eine zuvor festgelegte Mindestdifferenz (2 Zyklen Ct-Unterschied) sollte die Entscheidungsfindung vereinfachen.

Trotzdem war es nicht selten schwierig eine definitive Aussage über die Existenz von Enzym-Aptamer-Komplexen bzw. diffundierten Aptameren zu treffen, da es vor allem auch im Vergleich der Fraktionen eines Laufes unter einander teilweise zu Widersprüchen kam. Sichtbar wird dies beispielsweise in der Vereinigung sowohl der 2. als auch 3. Fraktion des ersten Selektionszyklus der Plasminselektion zur Herstellung von Einzelstrang-DNA für den zweiten Zyklus (siehe 5.2.3). Hier waren nach Sichtung der Ct-Wert-Differenzen keine großen Unterschiede zwischen beiden Fraktionen auszumachen. Uns war zwar bewusst, dass die dritte Fraktion durch das beinhaltende BSA einen diesbezüglich

selektiven Charakter aufweisen könnte, trotzdem entschieden wir uns hier jedoch dafür, beide Fraktionen zu verwenden, um nicht direkt im ersten Zyklus mögliche potente Aptamere zu verwerfen.

Es wird ersichtlich, dass diese Art der Entscheidungsfindung konsequenterweise dann doch in der Verwendung eines einzigen großen Selektionsfensters resultieren muss, wenn die Ergebnisse der qPCR keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen aufzeigen.

Weitere Probleme, die bei der Interpretation der qPCR-Ergebnisse auftraten, waren zum einen, dass selbst bei wiederholter qPCR und teilweise sogar wiederholtem Selektionszyklus unsere selbstgesetzte Entscheidungsgrenze nicht überschritten wurde oder zum anderen, dass sich der ssDNA-Pool trotz teilweise sehr großer Ct-Differenzen (Faktor X1a-SELEX) nach Durchführung der Filterbindung als nicht-zielproteinaffin entpuppte.

Als Gegenbeispiel dafür, dass auch nach Aufteilung des Selektionsfensters in mehrere Fraktionen die entsprechende Erfolgskontrolle mittels qPCR gelingen kann, ist nun die im Vorhinein kurz erwähnte Arbeitsgruppe aus Atlanta um den Autor Patrick Ruff genannt: Sie veröffentlichten 2012 eine Arbeit, in welcher die Aptamer-Selektion per CE-SELEX ebenfalls mit qPCR anstatt LIF-Detektion gekoppelt wurde. Zur Etablierung der Methode wurde ein ssDNA-Aptamer gegen BSA selektiert. Anders als in unserer Arbeit begann das Selektionsfenster hier erst kurz hinter dem Proteinpeak und endete kurz vor dem Beginn des ssDNA-Bibliothek-Pools. Zudem erfolgte eine wesentlich feinere Aufteilung des Selektionsfensters in insgesamt sieben Fraktionen à 2 Minuten Länge, wobei hier der ssDNA-Pool selbst in den Bereich der Fraktionskollektion kam. Ein weiterer großer und interessanter Unterschied zu unserer Methode ist der, dass der Nachweis von Protein-Aptamer-Komplexen nicht in ein und demselben Selektionszyklus erfolgen sollte (unser Kriterium war eine ausreichende Ct-Differenz zwischen Leerwert und Selektionslauf): Nach Durchführung des Selektionslaufes wurden die direkten Ct-Werte der gesammelten Fraktionen verglichen und unter den vordersten Fraktionen, diese mit dem niedrigsten Wert ausgewählt. Ein Leerwert wurde nicht erhoben. Die eigentliche Erfolgskontrolle erfolgte nun in zwei weiteren CE-Selektionsläufen, in welche zum einen der ausgewählte Fraktionspool zusammen mit dem Zielprotein in einer jedoch weitaus höheren Konzent-

ration als im initialen Selektionslauf eingespeist wurde und zum anderen die Negativkontrolle ohne Zielprotein durchgeführt wurde. Gleiche Fraktionen wurden hier nun auf C_t -Differenz untersucht. Es zeigte sich der größte Unterschied an der Stelle der initial ausgewählten Fraktion, was als ein Nachweis von Protein-Aptamer-Komplexen gedeutet wurde (Ruff et al., 2012).

Schlussendlich zeigen Ruff et al. im direkten Vergleich mit unserer Arbeit eine arbeitsaufwendigere Methode, in welcher es jedoch gelingt, eindeutige Aussagen aus den qPCR-Ergebnissen zu ziehen, in dem in einer separaten Erfolgskontrolle deutlich höhere Konzentrationen des Zielproteins (0,5 μ M im Selektionslauf vs. 100 μ M) auch signifikantere Unterschiede (C_t -Differenz: 7-8 Zyklen) in der qPCR erzeugen.

Unabhängig von möglichen ssDNA-Unterschieden in einzelnen Fraktionen muss bezüglich unserer Selektionskriterien grundsätzlich jedoch vor allem die Frage diskutiert werden, wie es überhaupt begründet sein kann, dass wir in der qPCR-Analyse der einzelnen Zyklen, unseren Kriterien nach, größtenteils ausreichende C_t -Wert-Differenzen zwischen Leerwert und Selektionslauf feststellten, letztlich aber in der Filterbindungsanalyse keine Bindung der selektierten Aptamere nachgewiesen werden konnten. Diesbezüglich sind nun einmal beide Vorgänge (zum einen die Selektion mit CE, zum anderen der Filterbindungsvorgang selbst) vor dem Hintergrund dieser Frage kritisch zu beleuchten.

Betrachtet man die eigentliche Selektion genauer, so muss erörtert werden, warum ssDNA in den Selektionsläufen im Outlet erscheint, obgleich diese offensichtlich nicht mit den eingesetzten Zielenzymen assoziiert ist. Folglich wurde daraufhin später in der qPCR eine C_t -Wert-Differenz detektiert, die jedoch scheinbar nicht mit der Anwesenheit von bindenden Aptameren assoziiert war.

In Bezug auf die CE mündet ein „zu viel“ an „falscher“ ssDNA automatisch in der Frage nach dem Vorliegen von Kontamination. Da die CE-Prozedur an sich das wahrscheinlich größte Risiko einer Kontamination während der gesamten Selektion beherbergt, werden nun verschiedene Versuchs- bzw. Selektionsabläufe beschrieben und gleichzeitig auf mögliche Ursachen einer Kontaminationsproblematik hingewiesen.

Hierbei könnte zum einen die Kapillare, welche bei jedem Zyklus in das, einen hochkonzentrierten ssDNA-Pool enthaltenden, Selektionsgemisch eingetaucht wird, die größte

Kontaminationsquelle darstellen. Trotz regelmäßigen und gründlichen Waschens und Abwischens vor und nach den Selektionsläufen, lässt sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht immer verhindern, dass ein Teil der ssDNA-Stränge nicht entfernt wird und somit Umfeld, Gegenstände oder möglicherweise sogar Reagenzien im Laufe der Zeit kontaminiert werden.

Um generell auch bereits den Austritt einer zu hohen Menge und in Bezug auf das Protein unspezifischer ssDNA-Sequenzen zu minimieren, wurden die Selektionsläufe so konfiguriert, dass diese nur bis zum Erreichen der hinteren Grenze des Selektionsfensters (Minute 20) durchgeführt wurden. Zu diesem Zeitpunkt war ein Austritt des Hauptpools (Peak bei ca. 33 Minuten) an ssDNA aus der Kapillare prinzipiell nicht möglich. Darüber hinaus wurde der Inhalt der Kapillare in zwei anschließenden retrograden Spülläufen („reverse Rinse“) wieder zum Inlet, zurück- bzw. herausgespült. So sollten unnötig hohe Kontaminationen im Bereich des Outlets vermieden werden, da diese ggf. das gesamte Selektionsergebnis beeinflussen könnten.

Eine andere Betrachtungsweise ist, dass während der Kapillarelektrophorese anders als in der qPCR/PCR, eine Negativkontrolle mit beispielsweise destilliertem und somit definitiv DNA freiem Medium in unserem Ablauf nicht durchgeführt wurde und somit kontaminierende Sequenzen im Outlet als solche nicht direkt nachgewiesen wurden. Rückbetrachtend wäre dies lediglich durch eine separate Kontroll-PCR einer Probe des Trägerpuffers aus dem Outlet-Gefäß möglich gewesen. Diese hätte vor jedem Selektionslauf entnommen werden müssen.

Im Hinblick auf die weiteren Schritte eines jeden Selektionszyklus (qPCR, asymmetrische PCR, PCR) stellt das destillierte Wasser bzw. die Reagenzien, welches wir für die PCR-Mastermixe verwendeten eine weitere potentielle Kontaminationsquelle dar. Die große Gefahr bei Kontaminationen rund um die PCR-Reaktionsansätze ist die, dass aus Zufall in den Ansatz hineingeratene DNA-Moleküle hierbei massiv vervielfältigt werden und folglich mit den potenten und bisher selektierten ssDNA-Strängen um die Polymerasenbindung konkurrieren, bzw. dessen Amplifikation einschränken.

Diese Form der Kontamination trat während eines Zyklus tatsächlich auf: Da uns die basale Kontamination aller PCR-Ansätze jedoch während der Selektion anhand einer positiven Negativkontrolle auffiel, konnten daraufhin sämtliche Reaktionen mit neuem, sterilen dH₂O neu angesetzt und so erreicht werden, dass die Kontamination zumindest makroskopisch nicht mehr nachweislich vorhanden war.

Wie es nun passieren kann, dass zwei komplette Selektionen unter diesen Umständen vor dieser Betrachtungsweise ohne Erfolg verlaufen, lässt sich am ehesten nur durch den Weichenstellungscharakter des jeweils ersten Zyklus erklären. Kommt es nun vor, dass potente Binder zum einen durch eine hochgradige Kontamination gleich am Anfang „verdrängt“ werden, oder, wie weiter vorne beschrieben, erst gar nicht vom Selektionsfenster eingefasst werden, so kann dies durchaus dazu führen, dass in den folgenden Zyklen keine Bildung von Enzym-Aptamer-Komplexen mehr zustande kommt, zumal dieser Effekt mit jedem weiteren, und möglicherweise ebenfalls kontaminierten Zyklus zusätzlich noch verstärkt wird.

Abgesehen und unabhängig von einer Kontamination oder falsch gesetzten Selektionsfenstern, könnten während des Kapillardurchlaufes unter anderem jedoch auch Interaktionen zwischen ssDNA-Molekülen selbst auftreten, die wiederum eine entsprechende Proteinbindung unmöglich werden lassen. Darüber kann hier jedoch nur spekuliert werden. In Aptamerselektionen werden per se nur Einzelstränge eingesetzt. Hierdurch könnte es durch die enorm hohe Varianz an auftretenden Sequenzen statistisch gesehen recht wahrscheinlich zur Ausbildung von, durch zwei verschiedene Moleküle definierten, partiellen DNA-Doppelsträngen (dsDNA) kommen (s. Abb. 29), da manche Basenfolgen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls als Komplementärsequenz in einem anderen DNA-Molekül vorliegen.

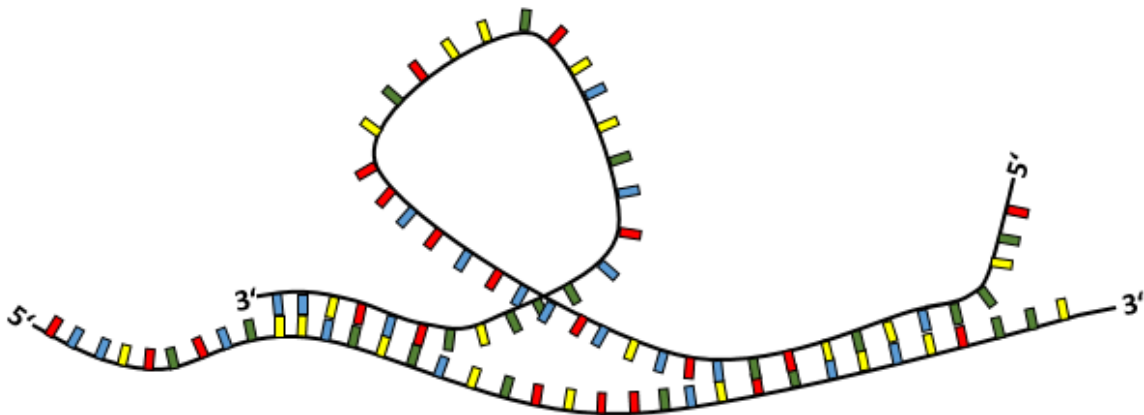


Abb. 29: Modellhafte Darstellung einer möglichen Interaktion zweier ssDNA-Stränge auf Grund komplementärer Sequenzabschnitte. Eine Enzymbindung scheint in diesem Fall nur erschwert zustande kommen zu können.

Prinzipiell sollte die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung solcher Heteroduplices durch das initiale Erhitzen der gesamten ssDNA-Bibliothek und daraufhin rasches Abkühlen auf Eis reduziert werden. Trotzdem könnten auch hiernach noch auch größere Heteroduplices auftreten, deren Einzelmoleküle somit nicht mehr für mögliche Aptamer-Enzym-Interaktionen zur Verfügung stehen.

An diesem Punkt erscheint es sinnvoll sich die verschiedenen Vorbereitungs- und Inkubationsparameter der bereits erwähnten Arbeiten anderer Gruppen mit der von uns durchgeführten Prozedur zu vergleichen (Tabelle 38).

Tab. 38: Aufgeführt sind die durchgeführten Schritte der Vorbereitung der ssDNA-Bibliothek sowie der Inkubation mit dem jeweiligen Zielenzym. Verglichen werden die Arbeitsgruppe um Berezowski in der Selektion von Aptameren gegen PFTase, die Arbeitsgruppe um Mosing bei einer Aptamer-Selektion gegen HIV-Reverse-Transkriptase sowie unsere Arbeit. Die Vorbereitung sowohl bei APC als auch Plasmin und FXIa wurde jeweils identisch durchgeführt.

Vorbereitungsschritt	Berezowski et. al	Mosing et. al	Diese Arbeit
Denaturierung	95 °C, 10 Minuten	39 °C, kurz	85 °C, 2 Minuten
Kühlung	Dynamisch (7,5°C/min) auf 20 °C	Bei RT, ca. 20 °C	Auf Eis, bis auf ca. 4 °C
Inkubation mit Zielenzym	20 °C, 30 Minuten	RT, ca. 20 °C für 20 Minuten	RT, ca. 20 °C für 15 Minuten

Im Vergleich lässt sich feststellen, dass wir in unseren Experimenten am Ende schließlich die kürzeste Inkubationszeit zwischen Enzym und ssDNA-Bibliothek verwendeten. Rückbetrachtend, kann dies bei einem Aptamer-affinen Zielenzym, wie es APC ist, zu einer Selektion von hochaffinen Aptameren führen, wie wir zeigen konnten. Jedoch könnte es möglicherweise gerade bei scheinbar instabilen sowie nur schwach ssDNA-kompatiblen Enzymen, wie es sich beispielsweise für Plasmin herausstellte, sinnvoll sein, initial eine deutlich höhere Inkubationszeit zu verwenden. Dies wird vor dem Hintergrund, dass selbst Mosing mit einem DNA-hochaffinen Zielenzym, wie es HIV-Reverse-Transkriptase ist, eine längere Inkubationszeit verwendete, noch einmal zusätzlich unterstrichen.

Berezovski erwähnt darüber hinaus einen interessanten Ansatz bzgl. der Inkubationszeit des ssDNA-Pools mit dem Zielenzym, in welchem er die Länge der Inkubationszeit als Prädiktor für die Höhe der Affinität des zu selektierenden Aptamers ausmacht. Je kürzer die Inkubation mit dem entsprechenden Zielenzym, desto affiner ist der bestmögliche Aptamerpool bei darauffolgender erfolgreicher Selektion.

Ganz nebenbefundlich und unabhängig von allen bisherigen Abschnitten fiel uns bei den durchgeführten Selektionen eine auch im Nachhinein unerklärbare und bisher nicht in der Form beschriebene Besonderheit auf. Wurde zusammen mit dem Pool der ssDNA-Bibliothek eine generell höhere Enzymkonzentration in die Kapillare injiziert, wie dies bei einigen Vorversuchen zur Identifizierung des entsprechenden Enzympeaks der Fall war, so übte dies offensichtlich einen Einfluss auf die Migrationszeit des ssDNA-Pools aus.

Normalerweise befindet sich der Haupt-Peak des ssDNA-Bibliothekspools im „Leer-Lauf“ bei ca. 27 +/- 2,5 Minuten. Dies war auch in den durchgeführten Selektionsläufen, v. a. im jeweils ersten Zyklus einer jeden Selektionsrunde reproduzierbar darstellbar. Im Gegensatz zu den weiteren und folgenden Selektionszyklen wurde hier nämlich die ursprüngliche IHT1-Bibliothek in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt. Beispielsweise bei APC wurde diese in einem deutlichen Anstieg der Absorptionskurve gegen Ende des 20-Minütigen Selektionsfensters angedeutet, bevor der Selektionslauf beendet wurde. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen in den Selektionsläufen lagen, wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, zwischen 0,5-1 μM .

Was im Gegensatz zur Selektion gegen APC jedoch in den Selektionen von Plasmin sowie Faktor XIa auffiel ist, dass der ssDNA-Peak in einigen Fällen um ein deutliches nach

hinten verschoben wurde, sobald höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden. Dies musste am ehesten auf die deutlich höheren eingesetzten Konzentrationen der Zielenzyme zurückgeführt werden, da sich ansonsten keine anderen Parameter änderten.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Gegenwart eines Enzyms generell einen verschiebenden Einfluss auf einen ssDNA-Pool hat.

Für unsere Selektionen sahen wir diesen Effekt als nur gering bedeutend an, da wir zur eigentlichen Selektion durchweg deutlich niedrigere Konzentrationen an Zielenzym verwendeten und sich ein ssDNA-Peak in den Selektionsläufen, die wir bis zur 20. Minute durchführten, gegen Ende des Selektionslaufes bereits am Detektionsfenster andeutete. Somit erachten wir das Scheitern der Selektion von Aptameren gegen Plasmin und FXIa als unabhängig von diesem, vorstehend beschriebenen Effekt.

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die bisher am Institut noch verhältnismäßig neue Methode der CE-SELEX zu optimieren sowie das Potential der Methode auszuloten. Die Methode sollte mittels Aptamer-Selektion gegen APC etabliert werden. Darüber hinaus sollten im optimalen Falle zwei weitere Aptamere sowohl gegen aktivierten Faktor XI (FXIa) als auch gegen Plasmin identifiziert werden, um hiermit die Entwicklung von entsprechenden Aptamer-basierten Testsystemen (OECA) voran zu treiben.

Im Allgemeinen bestätigte sich einer der in der Literatur beschriebenen Vorteile der Aptamer-Selektion mittels Kapillarelektrophorese, nämlich die erfolgreiche Selektion eines potenten Aptamer-Pools nach nur wenigen Selektionszyklen. So gelang es uns bereits nach fünf Zyklen, mit NB-1 ein potentes und hochspezifisches Aptamer gegen APC zu selektieren. Dieses zeigte in weiteren Charakterisierungsversuchen ein nahezu identisches Sequenzmotiv zu dem bereits existierenden APC-Aptamer HS02-52G und zudem eine höchstwahrscheinlich identische Bindungsstelle auf der Enzymoberfläche.

Im Gegensatz hierzu entpuppten sich die Experimente zur Selektion gegen Faktor XIa und Plasmin aus mehreren potentiellen Gründen (Enzym-Instabilität, Fraktionsunterteilte Selektion sowie nur bedingt eindeutige Erfolgsüberprüfung mittels qPCR) als nicht erfolgreich und es zeigte sich abschließend dementsprechend keine Bindung der selektierten ssDNA an das entsprechende Zielenzym.

So gelang es auch mit einer alternativen Methode, in diesem Fall der CE-SELEX, nicht die Bandbreite entsprechender Aptamere gegen aktivierte Gerinnungsfaktoren zu erweitern. Die möglichen Ursachen können nach genauerer Betrachtung vielfältig sein: So zeigte sich v. a. Plasmin als ausgesprochen instabil und bedurfte eines Hinzugebens von BSA in den Selektionsansatz. In diesem Fall könnten wir zudem die Inkubationszeit zwischen ssDNA-Bibliothek und Plasmin als zu gering gewählt haben. Die in unserem Fall recht früh gesetzte, hintere Grenze des Selektionsfensters brachte zudem das Risiko mit sich, mögliche Aptamere nicht zu separieren. Die Aufteilung des Selektionsfensters in insgesamt drei Fraktionen wurde als ein vielversprechender Ansatz angewandt, entpuppte sich jedoch im Nachhinein als möglicherweise nicht zielführend.

Zu den genannten Punkten könnten zusätzlich Risiken wie Kontamination der Kapillare sowie eventuelle Interaktionen der einzelnen ssDNA-Moleküle selbst kommen. Auch ein letztlich falsch-negatives Ergebnis der sehr stringenten Filterbindungsanalyse ist denkbar. Trotz aller hier erwähnten, theoretisch möglichen technischen und methodischen Ursachen des Scheiterns einer Selektion, festigte sich die Theorie, dass der Erfolg der Selektion eines affinen ssDNA-Pools in erster Linie durch die Protein-/Enzymstruktur selbst bestimmt wird. Dies zeigte sich insbesondere im Fall des erfolgreich selektierten APC-bindenden Aptamers NB-1, welches eine auch in zwei weiteren, unabhängigen Selektionen gefundene Konsensussequenz aufweist.

Es lässt sich nun ausblickend feststellen, dass APC nachgewiesenermaßen ein geeignetes Zielenzym zur Erfolgsüberprüfung der CE-SELEX darstellt und auch für weitere Etablierungsversuche eine vielversprechende Rolle einnehmen könnte. Das Potential von NB-1 kann in weiteren Charakterisierungsversuchen, wie z.B. den Einfluss des Aptamers auf die Aktivität des Enzyms oder die Verwendbarkeit als Fängerligand in einem APC-spezifischen Enzyme-Capture-Assay ausgelotet werden.

Zusammengefasst ergibt sich als übergeordnetes Fazit, dass die Struktur des Zielenzym augenscheinlich den entscheidenden Einfluss auf den Erfolg oder Misserfolg einer Aptamer-Selektion auszuüben scheint und hiermit dem Potential der gesamten Methode natürliche Grenzen gesetzt sind.

8. Literaturverzeichnis

- Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI Deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *N Engl J Med* 1991; 325: 153-158
- Berezovski M, Krylov SN. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures - a single experiment reveals equilibrium and kinetic parameters of protein-DNA interactions. *J Am Chem Soc.* 2002; 124: 13674-13675
- Berezovski M, Drabovich A, Krylova SM, Musheev M, Okhonin V, Petrov A, Krylov SN. Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures: A Universal Tool for Development of Aptamers. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 3165–3171
- Berezovski M, Musheev M, Drabovich A, Krylov SN. Non-SELEX Selection of Aptamers. *J Am Chem Soc* 2006; 28: 1410–1411
- Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992; 355: 564-566
- Bolton-Maggs, PH. Factor XI Deficiency--Resolving the Enigma? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 97–105
- von dem Borne PA, Meijers JC, Bouma BN. Feedback Activation of Factor XI by Thrombin in Plasma Results in Additional Formation of Thrombin That Protects Fibrin Clots from Fibrinolysis. *Blood* 1995; 86: 3035–3042
- Carrieri C, Galasso R, Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, Colucci M. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and factor XI in platelet-mediated fibrinolysis resistance: a thromboelastographic study in whole blood. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 154–162
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular Mechanisms of Fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129: 307–321
- Cheng T, Liu D, Griffin J, Fernández J, Castellino F, Rosen E, Fukudome K, Zlokovic B. Activated Protein C Blocks p53-Mediated Apoptosis in Ischemic Human Brain Endothelium and Is Neuroprotective. *Nat Med* 2003; 9: 338–342
- Concepcion J, Witte K, Wartchow C, Choo S, Yao D, Persson H, Wei J, Li P, Heidecker B, Ma W, Varma R, Zhao LS, Perillat D, Carricato G, Recknor M, Du K, Ho H, Ellis T, Gamez J, Howes M, Phi-Wilson J, Lockard S, Zuk R, Tan H. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Comb Chem High Throughput Screen* 2009; 12: 791-800
- Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1311-1320
- Dong L, Tan Q, Ye W, Liu D, Chen H, Hu H, Wen D, Liu Y, Cao Y, Kang J, Fan J, Guo W, Wu W. Screening and Identifying a Novel ssDNA Aptamer against Alpha-fetoprotein Using CE-SELEX. *Sci Rep* 2015; 5: 15552
- Draxler DF, Medcalf RL. The Fibrinolytic System—More Than Fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2015; 29: 102–109

- Eli Lilly and Company, Pressemitteilung vom 25.10.2011: "Lilly Announces Withdrawal of Xigris® Following Recent Clinical Trial Results". <https://www.prnewswire.com/news-releases/lilly-announces-withdrawal-of-xigris-following-recent-clinical-trial-results-132519063.html> (Zugriffsdatum: 01.05.2018)
- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818–822
- Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and Function of Factor XI. *Blood* 2010; 115: 2569–2577
- Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest* 2003; 124: 26S-32S
- Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic Acid Aptamers - From Selection in Vitro to Applications in Vivo. *Acc Chem Res* 2000; 33: 591–599
- Gal SW, Amontov S, Urvil PT, Vishnuvardhan D, Nishikawa F, Kumar PK, Nishikawa S. Selection of a RNA Aptamer That Binds to Human Activated Protein C and Inhibits Its Protease Function. *Eur J Biochem* 1998; 252: 553–562
- Guo X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *J Biophotonics* 2012; 5: 483-501
- Hajjar KA. The endothelium in thrombosis and hemorrhage. In: *Thrombosis and Hemorrhage*, Hrsg. Loscalzo J, Schaefer AI. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2003; 206–219
- Hamedani NS, Blümke F, Tolle F, Rohrbach F, Rühl H, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B, Müller J. Capture and Release (CaR): A Simplified Procedure for One-Tube Isolation and Concentration of Single-Stranded DNA during SELEX. *Chem Commun (Camb)* 2015; 51: 1135–1138
- Hermann T, Patel DJ. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* 2000; 287: 820–825
- Jeter ML, Ly LV, Fortenberry YM, Whinna HC, White RR, Rusconi CP, Sullenger BA, Church FC. RNA aptamer to thrombin binds anion-binding exosite-2 and alters protease inhibition by heparin-binding serpins. *FEBS Lett* 2004; 568: 10-14
- Koroshetz, WJ. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 1996; 334: 1405–1406
- Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Berlin - New York: Springer-Verlag, 1993
- Lee JH, Canny MD, De Erkenez A, Krilleke D, Ng YS, Shima DT, Pardi A, Jucker F. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18902-18907
- Marlar RA, Neumann A. Neonatal Purpura Fulminans due to Homozygous Protein C or Protein S Deficiencies. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16: 299–309
- Mayer G. Die Chemische Biologie von Aptameren. *Angew Chem* 2009; 121: 2710–2727
- Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 20-21

- Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Aptamers with Affinity for HIV-1 Reverse Transcriptase. *Anal Chem* 2005; 77: 6107–6112
- Müller J, Freitag D, Mayer G, Pötzsch B. Anticoagulant Characteristics of HD1-22, a Bivalent Aptamer That Specifically Inhibits Thrombin and Prothrombinase. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2105–2112
- Müller J, El-Maarri O, Oldenburg J, Pötzsch B, Mayer G. Monitoring the Progression of the in Vitro Selection of Nucleic Acid Aptamers by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390: 1033–1037
- Müller J, Isermann B, Dücker C, Salehi M, Meyer M, Friedrich M, Madhusudhan T, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. An Exosite-Specific ssDNA Aptamer Inhibits the Anticoagulant Functions of Activated Protein C and Enhances Inhibition by Protein C Inhibitor. *Chem Biol* 2009; 16: 442–451
- Müller J, Becher T, Braunstein J, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Profiling of Active Thrombin in Human Blood by Supramolecular Complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50: 6075–6078
- Müller J, Friedrich M, Becher T, Braunstein J, Kupper T, Berdel P, Gravius S, Rohrbach F, Oldenburg J, Mayer G, Pötzsch B. Monitoring of Plasma Levels of Activated Protein C Using a Clinically Applicable Oligonucleotide-Based Enzyme Capture Assay. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 390–398
- Naito K, Fujikawa K. Activation of Human Blood Coagulation Factor XI Independent of Factor XII. Factor XI is activated by Thrombin and Factor Xia in the Presence of Negatively Charged Surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266: 7353–7358
- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET Jr, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a Targeted Anti-VEGF Aptamer for Ocular Vascular Disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 123–132
- Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A. The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem*. 1993; 268: 17651-17654
- Rimmele M. Nucleic Acid Aptamers as Tools and Drugs: Recent Developments. *Chembiochem* 2003; 4: 963–971
- Ruff P, Pai RB, Storici F. Real-Time PCR-Coupled CE-SELEX for DNA Aptamer Selection. *ISRN Molecular Biology* 2012; 2012: 939083. doi:10.5402/2012/939083
- Salomon O, Steinberg DM, Seligshon U. Variable Bleeding Manifestations Characterize Different Types of Surgery in Patients with Severe Factor XI Deficiency Enabling Parsimonious Use of Replacement Therapy. *Haemophilia* 2006; 12: 490–493
- Sambrook DW, Russel J. *Molecular Cloning - A laboratory manual*, 3rd edition. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Stockley PG. Filter Binding Assays. In: *Methods in Molecular Biology, DNA-Protein Interactions*; Hrsg. Moss T, Leblan B. New York City, USA: Humana Press, 2009; 543: 1–14
- Tasset DM, Kubik MF, Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J Mol Biol*. 1997; 272: 688-698

Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G. By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. PLoS ONE, 2014; 9: e114693. doi: 10.1371/journal.pone.0114693

Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. Science 1990; 249: 505–510