



*In vitro* Endothelialisierung polymerer Oberflächen  
mittels Aptamertechnologie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Dipl.-Biochem. Christian Schulz  
aus Berlin

März 2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2011 bis März 2016 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Lendlein am Institut für Biomaterialforschung der HZG in Teltow angefertigt.



**Gutachter:**

Prof. Dr. Andreas Lendlein (Universität Potsdam)

Prof. Dr. Nan Ma (Freie Universität Berlin)

Disputation am: 31.08.2016

## **VERSICHERUNG**

*In dieser Erklärung versichere ich Christian Schulz die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Prüfungsarbeit an anderer Stelle eingereicht worden.*

*Berlin, den 31.03.2016*

## **PUBLIKATIONEN (DIE ARBEIT BETREFFEND)**

Teile dieser Arbeit wurden in den nachfolgend genannten Publikationen veröffentlicht:

**C. Schulz**, M. Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Viability and function of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 52(2-4), (2012), 267-82

**C. Schulz**, M. von Rüsten-Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Adherence and shear-resistance of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 57(2), (2014), 147-58

## ABKÜRZUNGEN

AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: <i>atomic force microscopy</i> )
at-%	Atomprozent
ATCC	amerikanische Stammsammlung für Referenzmikroorganismen und Zelllinien (engl.: <i>American Type Culture Collection</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit/en
BMS	Edelstahl Stent (engl.: <i>bare metal stent</i> )
bp	Basenpaar/e
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cLSM	konfokales Laser-Rastermikroskop (engl.: <i>confocal laser scanning microscope</i> )
d	Tag/e
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytosin
DCM	Dichlormethan
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser ("Reinstwasser")
DES	Medikamenten beschichteter Stent (engl.: <i>drug eluting stent</i> )
dG	Desoxyguanosin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
EC	Endothelzelle/n
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: <i>endothelial growth factor</i> )
EPC	endotheliale Progenitorzelle/n (engl.: <i>endothelial progenitor cell/s</i> )
ePTFE	expandiertes Polytetrafluoroethylen ("Teflon")
etc.	et cetera
FA	fokale Adhäsionskomplexe (engl.: <i>focal adhesions</i> )
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
FDA	US-Arzneimittelbehörde (engl.: <i>Food and Drug Administration</i> )
FDA	Fluoresceindiacetat
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (engl.: <i>fibroblast growth factor</i> )
g	Erdbeschleunigung (engl.: <i>relative centrifugal force</i> )
GC	Gaschromatographie
h	Stunde/n
HUVEC	humane Endothelzelle/n aus der Nabelschnurvene (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cell/s</i> )
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1.000 g/mol)
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
M	molar
min	Minuten
N	Nukleotid (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )

PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyetherimid
PET	Polyethylenterephthalat ("Dacron")
PI	Propiumiodid
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
$R_a$	arithmetrischer Mittelwert der Rauigkeit (engl.: <i>arithmetic average of absolute roughness</i> )
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reactive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i> )
$R_q$	quadratischer Mittenrauwert (engl.: <i>mean square roughness</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SA <sub>v</sub>	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (engl.: <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> )
sog.	sogenannte
ss	einzelsträngig (engl.: <i>single stranded</i> )
TCP	Gewebekulturplatte (engl.: <i>tissue culture plate</i> )
u.a.	unter anderem
U	Einheit enzymatischer Aktivität (engl.: <i>unit</i> )
UV	ultraviolett
vdW	van-der-Waals
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i> )
vgl.	vergleiche
vol-%	Volumenprozent
wt-%	Gewichtsprozent
WW	Wechselwirkung
$\Theta_{adv}$	voranschreitender Kontaktwinkel (engl.: <i>advancing contact angle</i> )
$\Theta_{rec}$	zurückziehender Kontaktwinkel (engl.: <i>receding contact angle</i> )
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
zzgl.	zuzüglich

## ZUSAMMENFASSUNG

Die stetig steigende Mortalität aufgrund arteriosklerotischer Erkrankungen ist ein wachsendes Problem unserer Gesellschaft. Bei dieser Erkrankung lagern sich zunehmend Plaques in der Gefäßwand von Blutgefäßen ab, was im Zusammenspiel mit der Einwanderung glatter Muskelzellen in einer Verringerung des Gefäßlumens resultiert. Die Behandlung dieses Krankheitsbildes mittels invasiver Therapien hat in den vergangenen Jahrzehnten immens an Bedeutung gewonnen und es werden pro Jahr mittlerweile mehr als eine halbe Million Bypass-Operationen durchgeführt. Da häufig geeignete autologe Gefäße fehlen, ist die Implantation synthetischer Surrogate bei vielen Patienten der einzig mögliche therapeutische Ansatz. Die Oberflächen der verwendeten Materialien sind hierbei aufgrund einer unzureichenden Hämokompatibilität autologen Gefäßen unterlegen. Von den zahlreichen Konzepten zur Verringerung der Thrombogenität artifizieller Implantate stellt die Generierung einer natürlichen anti-thrombogenen Schicht durch Besiedlung mit autologen Endothelzellen die vielversprechendste Strategie dar. Die Generierung einer funktionell-konfluenten und scherresistenten Endothelzellschicht gestaltet sich jedoch auf vielen synthetischen Oberflächen schwierig, da sie aufgrund ihrer Grenzflächeneigenschaften keine stabile Endothelialisierung erlauben. Moderne Endothelialisierungsstrategien verwenden daher niedrigmolekulare, zellbindende Liganden wie Peptide, Antikörper oder Aptamere für eine selektive Rekrutierung der Zellen. Da diesen Liganden Valenzen für weitere Interaktionen fehlen, kommt für sie meist nur eine kovalente Immobilisierung in Frage. Verfahren der kovalenten Immobilisierung können sich jedoch durch Alterierung der Substratoberfläche oder Veränderung der biologischen Aktivität der Liganden negativ auf die spätere Anwendung auswirken. Eine Alternative zur kovalenten Immobilisierung zellbindender Liganden ist die Verwendung ebenso optimierter, an das Substrat bindender Moleküle, welche über eine Vielzahl nicht-kovalenter physikalischer Interaktionen nach dem Prinzip der Multivalenz eine stabile Funktionalisierung ermöglichen.

Das Screening nach solchen optimiert an die Oberfläche eines polymeren Biomaterials bindenden Liganden wurde mittels eines auf Nukleinsäuren (Aptameren) basierenden *in vitro* Selektionsverfahrens durchgeführt. Als ein ideales Material für DNS-Liganden wurde Polyetherimid (PEI) in Form von Filmen ausgewählt, da es aufgrund seiner chemischen Struktur und seiner Grenzflächeneigenschaften über eine Vielzahl von Valenzen verfügt, um ausgeprägte physikalische Interaktionen mit DNS-Basen eingehen zu können. Ebenso stellte dieses Polymer durch seine vergleichbar gute Häm- und Biokompatibilität einen idealen Kandidaten für eine spätere Liganden unterstützte Endothelialisierung dar. Die *in vitro* Selektion zur Generierung PEI bindender DNS-Aptamere resultierte in der Aufklärung eines durch Thymin dominierten Bindungsmotives. Die bevorzugte Interaktion der Polymeroberfläche mit Thymin war dabei auf die chemische Struktur der Base zurückzuführen und einer damit verbundenen, im Vergleich zu anderen Nukleotidbasen geringeren elektrostatischen Repulsion durch das  $\pi$ -Elektronensystem sowie einer durch den hydrophoben Charakter von Thymin maximierten Entropie. Trotz einer fehlenden Materialelektivität gegenüber anderen Polymeren mit ähnlichen makroskopischen Grenzflächeneigenschaften konnte gezeigt werden, dass eine Generierung von multivalent bindenden Aptameren gegen die Oberfläche des ausgewählten Modellpolymers PEI möglich war und auf deren Grundlage eine bis in den Nanometerbereich flächendeckende Beschichtung polymerer Substrate erreicht werden konnte. In nachfolgenden *in vitro* Bindungsstudien zeigte sich, dass die Aptamerbindung unter dem Einfluss proteinogener Bestandteile instabil war. Dennoch konnte im Rahmen einer Machbarkeitstudie unter Anpassung des Zellkultursystems mit Hilfe der Aptamere ein zellbindender Ligand über nicht-kovalente Biotin/Streptavidin Interaktion auf PEI immobilisiert werden, mit dessen Hilfe die initiale Adhärenz und Scherresistenz von Endothelzellen im Vergleich zum unbehandelten Polymer signifikant verbessert wurde.

## SUMMARY

The steadily increasing mortality due to atherosclerotic diseases is a growing problem in our society. In this disease the vessel lumen is reduced by deposition of plaques at the wall of blood vessels in combination with smooth muscle cell migration. The treatment of this disorder by means of invasive therapies has become increasingly important in recent decades, so that currently more than half a million bypass surgeries are performed per year. However, often suitable autologous vessels are missing and the implantation of synthetic substitutes is the only possible therapeutic approach for many patients. Here the surfaces of the artificial materials used are inferior to autologous vessels due to insufficient hemocompatibility. There are many concepts for reducing the thrombogenicity of artificial implants, whereby the generation of a natural anti-thrombogenic layer by colonization with autologous endothelial cells is the most promising strategy. However, the generation of a functional-confluent and shear resistant endothelial cell layer is difficult on many synthetic surfaces, since they do not allow stable endothelialization due to its interfacial properties. Therefore modern endothelialization strategies use low-molecular cell-binding ligands such as peptides, antibodies or aptamers for selective cell recruitment. Since these ligands do not have additional valences for further interaction, covalent immobilization is mostly the only possibility to generate a stable surface functionalization. However, methods used for covalent immobilization can cause adverse effects on the subsequent application like an alteration of the substrate surface or changes in the biological activity of the ligand. An alternative to covalent immobilization would be the use of optimized substrate binding molecules for a stable functionalization, which allow a variety of non-covalent physical interactions on the principle of multivalency in the same manner like cell-binding ligands.

The screening for such optimized to the surface of a polymeric biomaterial binding ligands was carried out by means of an on nucleic acids (aptamers) based *in vitro* selection process. As an ideal candidate material for DNA-ligands polyetherimide (PEI) was selected in the form of films, as it has a variety of valences to interact by physical forces with DNA bases, based on its chemical structure and interface properties. Furthermore this polymer exhibited a comparatively good hemo- and biocompatibility. The *in vitro* selection for the generation of PEI binding DNA-aptamers resulted in the clarification of thymine dominated binding motive. The preferential interaction of the polymeric surface with thymine was attributed to the chemical structure of the base, which was connected with a decreased electrostatic repulsion of the  $\pi$ -electron system as well as the hydrophobic character maximizing entropy. Despite of a lack of material selectivity with regard to other polymers showing similar macroscopic interfacial properties, the generation of multivalent binding aptamers against the surface of the selected model polymer PEI could be shown. On the basis of these ligands an up to the nanometer range area wide coating of the polymeric substrate could be achieved. In subsequently performed *in vitro* binding studies it was elucidated, that the aptamer coating was instable under the influence of proteinogenic components in the surrounding fluid. Nevertheless, by adjusting the cell culture system, the non-covalent immobilization of a cell binding ligand, via non-covalent biotin/streptavidin interaction, with the surface bound aptamers was shown in a proof of concept, whereby the initial adherence and shear resistance of endothelial cells was significantly improved compared to the untreated polymer.





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.2. Synthetische Biomaterialien in klinisch etablierten kardiovaskulären Anwendungen .....	1
1.3. Hämkompatibilität artifizieller Oberflächen .....	2
1.4. Strategien zur Verbesserung der Hämkompatibilität artifizieller Oberflächen .....	3
1.5. Endothelialisierung artifizieller Oberflächen für kardiovaskuläre Anwendungen.....	4
1.6. Funktionalisierung polymerer Oberflächen mit endothelialisierungsfördernden Liganden ....	8
1.7. Modell zur Generierung DNS-basierter Liganden gegen polymere Oberflächen.....	10
<b>2. MOTIVATION UND ZIELE DER DISSERTATION .....</b>	<b>28</b>
<b>3. STRATEGIE UND KONZEPT .....</b>	<b>30</b>
<b>4. METHODEN.....</b>	<b>33</b>
4.1. Herstellung und Prozessierung von PEI-Filmen .....	33
4.2. Gaschromatographie .....	34
4.3. Grenzflächencharakterisierung der PEI-Filme.....	34
4.4. Zyto- und endotoxische Evaluierung .....	42
4.5. Zellbiologische Methoden.....	44
4.6. Molekularbiologische Methoden .....	50
4.7. <i>In vitro</i> Selektion.....	56
4.8. Statistik und Fehlerbetrachtung.....	62
<b>5. MATERIALIEN .....</b>	<b>63</b>
5.1. Geräte und Materialien.....	63
5.2. Synthetische Oligonukleotide und verwendete Längenmarker.....	65
5.3. Eukaryotische Zelllinien und Primärzellen .....	66
5.4. Kommerzielle Kits zur molekularbiologischen Analyse .....	66
5.5. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen .....	67
5.6. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	67
<b>6. ERGEBNISSE .....</b>	<b>68</b>
6.1. Grenzflächencharakterisierung nativer PEI-Filme auf nano bzw. atomarer Ebene .....	68
6.2. Grenzflächencharakterisierung nativer PEI-Filme auf mikro- und makroskopischer Ebene.....	71
6.3. Biologische Evaluierung und Endothelialisierungspotenzial der PEI-Filme .....	73
6.4. <i>In vitro</i> Selektion gegen die PEI-Film Oberfläche.....	84
6.5. Modellsystem zur Aptamer-cRGD unterstützten Endothelialisierung glatter PEI-Filme .....	95

<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
7.1. Grenzflächencharakterisierung der PEI-Filme .....	101
7.2. Biologische Evaluierung und Endothelialisierungspotenzial der PEI-Filme.....	102
7.3. <i>In vitro</i> Selektion PEI-Film bindender DNS-Aptamere.....	108
7.4. Analyse des PEI-Film bindenden Aptamermotives .....	110
7.5. Modellsystem zur Aptamer unterstützten Endothelialisierung von PEI-Filmen .....	116
<b>8. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>120</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>122</b>
<b>10. ANHANG .....</b>	<b>132</b>
10.1. Gaschromatographie (Headspace-GC) .....	132
10.2. Datenübersicht der Grenzflächencharakterisierung von PEI, PS und PEVA-Filmen.....	132
10.3. PCR-Optimierung für die <i>in vitro</i> Selektion gegen PEI-Filme.....	139
10.4. Verringerung der Hintergrundbindung der kombinatorischen DNS-Bibliothek .....	142
10.5. Untersuchung der Aptamerbindung unter Zellkulturbedingungen .....	142
<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>148</b>
<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>151</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>153</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>154</b>

### 1. EINLEITUNG

#### 1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs) infolge arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen sind weltweit nach wie vor die häufigste Todesursache. [1] 2008 verstarben mehr als 17 Millionen Menschen aufgrund von CVDs, was etwa einem Drittel aller krankheitsbedingten Tode entspricht. So starben beispielsweise 7,3 Millionen Menschen an einem Herzinfarkt und 6,2 Millionen an einem Schlaganfall. [2] Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen im koronar- oder zerebrovaskulären System entwickeln sich über Jahrzehnte. Dabei lagern sich zunehmend Blutfette in der Gefäßwand mittlerer und großer Blutgefäße als sogenannte Plaques ab. Durch die nachfolgende Einwanderung glatter Muskelzellen wird das Gefäßlumen verengt, was in der Folge zu einer Verringerung des Blutstroms und damit einer konsekutiven Sauerstoffunterversorgung des umliegenden Gewebes führen kann. Ebenso können die Plaques aufreißen und die Bildung eines Thrombus induzieren. Kommt es darauf hin zum Verschluss einer Koronararterie führt dies zum Herzinfarkt oder im Falle eines zerebralen Gefäßes zu einem Schlaganfall.

Mit dem Problem einer steigenden Mortalität durch CVDs sehen sich nicht nur die Länder der Ersten Welt, sondern ebenso Schwellenländer sowie Länder der Dritten Welt konfrontiert. In den vergangenen zwei Dekaden war die Zahl der Todesfälle in den einkommensstarken Ländern zwar rückläufig (aber noch immer um 50%), dafür stieg sie in den Mittel- und Niedriglohnländern in beunruhigender Weise an. Als Beispiel verringerte sich die Mortalität aufgrund von CVDs in Ländern der Ersten Welt um etwa 4%, wohingegen diese in Niedriglohnländern um über 40% anstieg. [2] Es stieg jedoch nicht nur die Zahl der Todesfälle weltweit, sondern ebenso die Anzahl der Erkrankungen in bedeutendem Ausmaße an. Gründe hierfür sind u.a. die steigende Lebenserwartung durch eine verbesserte medizinische Versorgung. Aus diesem Grund hat die Behandlung des Krankheitsbildes der Arteriosklerose mittels invasiver Therapien in den vergangenen Jahrzehnten immens an Bedeutung gewonnen. So werden pro Jahr mittlerweile mehr als eine halbe Million Bypass-Operationen durchgeführt. [3] Therapeutisch werden seit Jahrzehnten bevorzugt zwei Verfahren zur Weitung bzw. Wiedereröffnung verschlossener Blutgefäße angewendet. Auf der einen Seite die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) mit der Implantation von Stents aus Edelstahl (BMS, engl.: *bare metal stents*) oder Medikamenten beschichteten Stents (DES, engl.: *drug eluting stents*). Die Implantation von autologen Blutgefäßen ist die zweite etablierte Therapie. (Bypass-Operation) Wenn der Einsatz von Stents nicht länger möglich ist, wird der Bypass mit patienteneigenen Arterien (als zweite Wahl Venen) als bevorzugtem Implantat durchgeführt. Bedauerlicherweise sind aufgrund früher erfolgter Bypass-Operationen und/oder fortgeschrittener Arteriosklerose bei rund einem Drittel der Patienten keine passenden, autologen Gefäße mehr für einen Bypass vorhanden. Aus diesem Grund wird die Verwendung synthetischer koronarer Surrogate zunehmend wichtiger. [4, 5]

#### 1.2. Synthetische Biomaterialien in klinisch etablierten kardiovaskulären Anwendungen

In der klinischen Praxis kommen Gefäßprothesen aus Polyethylenterephthalat (PET; "Dacron") oder expandiertem Polytetrafluoroethylen (ePTFE) zum Einsatz. [6, 7] Diese Materialien zeigen in der klinischen Anwendung keine signifikanten Unterschiede, sind jedoch autologen Gefäßen klar

unterlegen. [8] Dennoch eignen sich diese Materialien ausreichend gut als großvolumiger Gefäßersatz. Der hohe Blutdurchfluss verhindert hierbei einen Verschluss des Implantates, da entstehende kleine Thromben abtransportiert werden, bevor ihr Wachstum zu einem Verschluss des Implantates führen kann. [9] Weitaus problematischer verhält es sich bei kleinlumigen Gefäßprothesen. ( $\varnothing \leq 6$  mm) [4] Hier zeigt sich besonders in Hinsicht auf die langfristige Anwendung eine niedrigere Durchgängigkeit von rund 70% (PET 71% und ePTFE 74%) nach einem Jahr sowie 58% (PET 59% und ePTFE 56%) nach drei Jahren, verglichen mit 90% und 81% für autologe Implantate. [10-13] Hervorgerufen durch das geringe Volumen und eine damit verbundene geringe Strömungsgeschwindigkeit des Blutes nach der Implantation, erhöht sich das Risiko von Komplikationen bis zum vollständigen Verschluss des Implantats, hervorgerufen durch ein Thrombuswachstum. [14, 15]

### 1.3. Hämokompatibilität artifizierender Oberflächen

Die beschriebenen Komplikationen können meist auf eine unzureichende Hämokompatibilität der verwendeten Polymere bzw. deren Oberflächen zurückgeführt werden. [7] Die Hämokompatibilität einer körperfremden Oberfläche hängt maßgeblich von den Interaktionen mit Bestandteilen des Blutes ab, wobei eine Vielzahl von Prozessen initiiert werden können, welche die Homöostase der Hämostase stören. [16]

Unter physiologischen Bedingungen ist ein Blutgefäß aus drei konzentrisch aufeinander aufbauenden Schichten aufgebaut. Die äußere Begrenzung bildet die hauptsächlich aus Fibroblasten und Bindegewebe aufgebaute Tunica adventitia. Ihre Aufgabe besteht in der Verankerung des Gefäßes im umliegenden Gewebe. Direkt darunter liegt die Tunica media, welche dem Gefäß durch seine große Anzahl an glatten Muskelzellen und zirkulär angeordneten Elastin- und Kollagenfasern die optimalen viskoelastischen Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Vasokonstriktion bzw. -dilatation verleiht. Auf der Innenseite eines Gefäßes befindet sich die Tunica intima, welche an der Grenzfläche zwischen Gefäßwand und Blut durch eine konfluente Schicht von Endothelzellen begrenzt ist. [17] Das Endothel ist als Barriere zwischen dem Blut und dem darunter liegenden thrombogenen Gewebe hochgradig an der Erhaltung der strukturellen Integrität des Blutgefäßes beteiligt. [18] Dabei bildet das intakte Endothel eine durchgehende, selektiv permeable und anti-thrombogene Schicht, welche aktiv die Koagulation reguliert und somit eine Aggregation des Blutes verhindert. [17, 19] Darüber hinaus reguliert das Endothel den Gefäßtonus, die Adhäsion von Leukozyten sowie die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen. [20, 21] Voraussetzung für die anti-thrombogenen Eigenschaften des Endothels ist die endotheliale Glykokalyx, welche als eine Art Saum sezerniert wird. Diese bis zu 500 nm dicke Schicht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen sowie adsorbierten Plasmaproteinen verhindert effektiv die Adhäsion von Thrombozyten. [22] Die anti-thrombogene und regulative Funktion ist jedoch nur bei einer intakten und konfluente Schicht aus Endothelzellen gegeben. Wird diese beispielsweise durch eine Verletzung beschädigt, kommt es an der Stelle der Läsion zunächst zum Kontakt zwischen Blut mit Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix (EZM). Nachfolgend werden in einer schnellen initialen Reaktion Thrombozyten an den Ort der Verletzung rekrutiert, welche dort adhären und weiter aktiviert werden. Dieses führt im Rahmen der voranschreitenden Koagulation zur weiteren Rekrutierung zirkulierender Thrombozyten und letztendlich der

Formierung eines irreversibel mittels Fibrin stabilisierten Thrombus, welcher den Bereich der Verletzung abdeckt. Hierbei können zwei Wege für die Auslösung der Gerinnungskaskade unterschieden werden, welche auf unterschiedliche Art initiiert werden. Der intrinsische Signalweg führt durch direkten Kontakt thrombogener Komponenten einer Oberfläche zur Koagulation, wohingegen diese beim extrinsischen Signalweg über lösliche Mediatoren (sog. Gewebefaktoren) beispielsweise aus beschädigten Zellen ausgelöst wird. [19, 23] Beide Signalwege münden schlussendlich in einer gemeinsamen Gerinnungskaskade, in deren Verlauf Thrombin gebildet wird, welches die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen vermittelt. Die wichtigsten zellulären Bestandteile der Gerinnungskaskade sind die Thrombozyten. Besonders in der initialen Phase erkennen und adhären sie über Glykoproteinrezeptoren an Oberflächen, welche nicht durch eine funktionell konfluente Endothelzellschicht bedeckt sind. Am Ort der Verletzung beginnen sie sich nach der Rekrutierung auszubreiten und durch Sezernierung löslicher Agonisten die Koagulation zu verstärken. Mit zunehmender Aktivierung spreizen sie sich immer weiter auf und formen im Zusammenspiel mit Fibrin den Thrombus. [24, 25]

Bei der Anwendung von polymeren Biomaterialien im kardiovaskulären Bereich kommt das Blut mit Oberflächen in Kontakt, die sich maßgeblich vom Endothel unterscheiden. Durch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften können dabei inflammatorische als auch koagulatorische Reaktionen an der artifiziellen Oberfläche ausgelöst werden. [26, 27] Zunächst bewirkt die mechanische Beanspruchung am Ort der Implantation eine durch beschädigte Zellen extrinsisch vermittelte Koagulation. Hinzu kommt als initiale Interaktion des Biomaterials mit dem Blut die schnelle Bildung einer amorphen Schicht aus passiv adsorbierten Proteinen. Die Komposition dieser Proteinschicht ist stochastisch und führt meist zu Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine, so dass diese denaturiert vorliegen können. Dabei sind in nativer Form innen liegende hydrophobe Aminosäurereste partiell nach außen gekehrt und somit die biologische Funktion des Proteins verändert. [26, 28] Dieser Prozess ist nicht zuletzt von Grenzflächeneigenschaften des Polymers wie der Benetzbarkeit, Topografie, chemischen Zusammensetzung und Oberflächenladung als auch von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums abhängig. [29, 30] Die normalerweise innenliegenden Epitope adsorbierter Proteine werden von Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran erkannt und führen zu einer intrinsisch vorangetriebenen Adhäsion und Aktivierung. Dies resultiert wiederum in einer Aktivierung der Koagulationskaskade. [31, 32]

### **1.4. Strategien zur Verbesserung der Hämokompatibilität artifizieller Oberflächen**

In der Klinik angewendete Strategien zur Verringerung des Risikos einer Thrombusbildung beinhalten die gezielte Gabe von Thrombozytenfunktionshemmern oder Antikoagulanzen (z.B. ASS, Clopidogrel, Heparin etc.) als Begleittherapie nach Implantationen. Eine solche Therapie reduziert die Gefahr thrombotischer Vorfälle erheblich, bedingt jedoch auch ein erhöhtes Blutungsrisiko sowie eine verringerte Koagulationsfähigkeit. [33, 34] Ein zielgerichteterer Ansatz ist der lokale Einsatz der genannten bioaktiven Moleküle als Beschichtung oder Matrixbestandteil von DES [34, 35] Diese Strategie reduziert die Thrombogenität der Materialoberfläche und beschränkt die oben genannten Nebenwirkungen hinsichtlich einer gehemmten Koagulation auf den Ort der Implantation. Dennoch treten auch bei dieser Strategie ungewollte Nebeneffekte wie In-Stent Restenosen auf, welche in einer erhöhten Proliferation glatter Muskelzellen begründet liegen. [36, 37]

Hinsichtlich der Optimierung der Hämokompatibilität von synthetischen Gefäßprothesen bzw. Biomaterialien gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen wird die Thrombogenität eines Materials stark von den Oberflächeneigenschaften selbst wie Topographie, Ladung, Benetzbarkeit und chemischer Zusammensetzung beeinflusst. [38, 39] Somit besteht eine Strategie darin die Material- und Oberflächeneigenschaften gezielt in Richtung einer verringerten Thrombogenität zu verändern. Jedoch ist diese stark vom Zusammenspiel unterschiedlicher Grenzflächeneffekte abhängig und somit eine Abschätzung der richtigen Eigenschaften schwierig. Hinzu kommt, dass die Forschungsergebnisse in Bezug auf Biomaterialien für den Blutkontakt teils widersprüchlich sind was Materialeigenschaften wie Oberflächenladung, -funktionalitäten, -benetzbarkeit oder -rauigkeit betrifft. [16, 40-42] Dennoch wird meist auf eine Verringerung der Proteinadsorption abgezielt, von der angenommen wird, der auf intrinsischem Weg ein das Thrombuswachstum auslösender Faktor zu sein. [43, 44] Das gleiche Ziel verfolgt die Strategie der Passivierung von Biomaterialoberflächen. Hierbei wird auf eine Reduzierung bzw. gänzliche Inhibierung der Interaktionen mit der physiologischen Umgebung abgezielt. Beispielsweise wird für die Verringerung der unspezifischen Proteinadsorption an polymere Oberflächen eine flächendeckende kovalente Immobilisierung von Oligo- (OEG) und Polyethylenglykol (PEG) eingesetzt. [45-47] Die geschlossene Schicht aus Polyethern schirmt Wasser nach außen hin ab und verhindert somit effektiv die Interaktion zwischen der Polymeroberfläche und Plasmabestandteilen. [48]

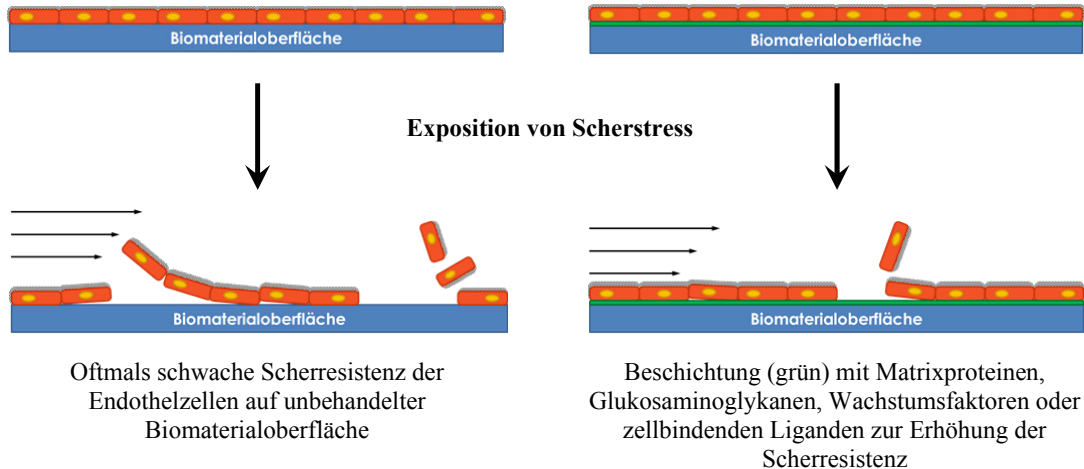
Ein weitaus zielgerichteterer Ansatz ist die Oberflächenbeschichtung von Implantatmaterialien mit bioaktiven Molekülen. Hierbei wird durch Funktionalisierung der artifiziellen Oberfläche versucht eine anti-thrombogene Oberfläche zu schaffen. Beispielsweise kommen als Antikoagulanzen wirkende Glukosaminoglykane (GAGs) wie Heparin für die Beschichtung von Biomaterialien zum Einsatz. Durch den hohen Sulfatisierungsgrad dieses linearen Polysaccharides und der damit verbundenen Vielzahl an negativen Ladungen wirkt es polyanionisch. Die antikoagulative Wirkung von Heparin beruht auf der durch ionische Wechselwirkungen vermittelten Bindung von im Blut zirkulierendem Antithrombin III, welches aktivierende Gerinnungsfaktoren wie Thrombin und den Prothrombinasekomplex hemmt. Im Zusammenspiel mit Heparin erhöht sich die Affinität von Antithrombin III gegenüber den Gerinnungsfaktoren um ein Vielfaches. In der Vergangenheit hat sich die Funktionalisierung von Biomaterialoberflächen mit Heparin als erfolgreiche Strategie zur Verringerung der Thrombogenität erwiesen, wobei ebenso ein positiver Effekt auf die Selektivität, Proliferation und Migration von Endothelzellen gezeigt werden konnte. [49, 50]

### **1.5. Endothelialisierung artifizieller Oberflächen für kardiovaskuläre Anwendungen**

Der vielversprechendste Ansatz zur Verbesserung der Hämokompatibilität ist die Generierung einer natürlichen anti-thrombogenen Oberfläche durch Besiedlung der artifiziellen Oberfläche mit einer funktionellen Endothelzellschicht. [51, 52] Dies kann durch Endothelialisierung des Implantats mittels vorausgehender *in vitro* Besiedlung mit autologen Endothelzellen als auch der Rekrutierung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPCs) *in situ* erreicht werden. [52-54]

Die Problematik bei der Endothelialisierung synthetischer Biomaterialoberflächen ist, dass die Besiedlung in vielen Fällen vom Material nicht unterstützt bzw. die Stabilität eines gebildeten Zelllayers unter dynamischen Bedingungen oftmals gering ist. In der Folge wird dieser beschädigt,

sobald das besiedelte Implantat dem Blutstrom ausgesetzt wird. [55] Aus diesem Grund werden Gefäßprothesen für die Endothelialisierung häufig vorab mit unterschiedlichsten bioaktiven Liganden modifiziert, um die Endothelzelselektivität, -dichte und, wie in der Abbildung 1 dargestellt, die Scherresistenz des Zelllayers zu erhöhen.



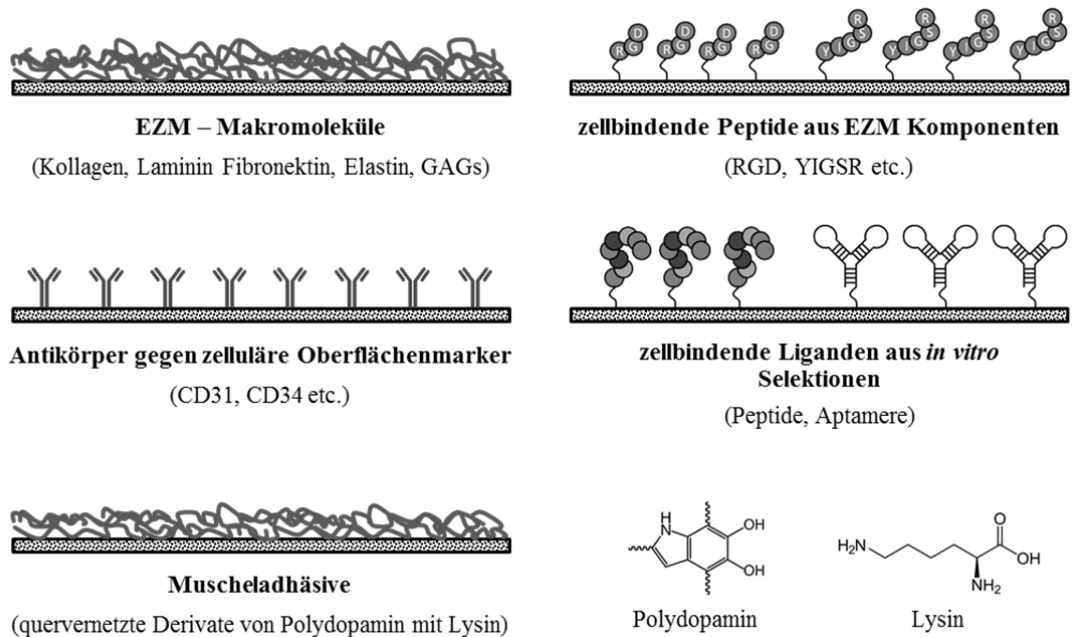
**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der Verbesserung der Scherresistenz des Endothelzellmonolayers durch Oberflächenbeschichtung der Biomaterialoberfläche mit adhäsiven und/oder wachstumsfördernden Faktoren.

Zu den am häufigsten angewandten Modifizierungsstrategien zählt die Nachahmung der natürlichen Umgebung von Endothelzellen. Hierbei werden zur Verbesserung der Endothelialisierung Makromoleküle der EZM wie Kollagen, Elastin, Laminin oder Fibronectin aber auch GAGs wie Heparin und Hyaluronsäure bzw. Kombinationen aus den genannten Komponenten auf der Biomaterialoberfläche präsentiert. [50, 56-58] Eine verbesserte Interaktion der Zellen mit dem beschichteten Substrat erfolgt über spezielle Membranrezeptoren (Integrine, Selektive etc.), welche bestimmte zellbindende Peptidsequenzen innerhalb der EZM-Proteine erkennen. [59] Als Folge dieser Interaktion werden rezeptorvermittelt Mechanismen innerhalb der Zellen angestoßen, welche sich direkt auf die Adhärenz, Proliferation, Migration und Geweberegeneration als auch inflammatorische Reaktionen auswirken. Um diese Effekte zu unterstützen, werden häufig zusätzlich bioaktive Mediatoren wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren mit in diese Funktionalisierungen eingearbeitet. [14, 50, 60] Da die eingesetzten makromolekularen EZM-Komponenten meist als natürliche Produkte entweder aus tierischen Erzeugnissen oder als rekombinante Proteine aus Zellkulturen extrahiert werden, besteht bei deren Verwendung für medizinische Applikationen immer ein gewisses Risiko für unerwartete immunologische Reaktionen oder eine eingeschränkte biologische Aktivität, aufgrund ihrer hohen strukturellen Komplexität und Variabilität. Weitergehend ist oft nur ein Teil von ihnen für die Zellinteraktion zugänglich, da ihre Orientierung auf der Oberfläche stochastisch ist und ihre Konformation nicht zuletzt von den Oberflächeneigenschaften des Substrates abhängt. [61] (Abbildung 2)

Als eine Alternative zu endothelialisierungsfördernden Beschichtungen mit diesen komplexen, makromolekularen EZM-Komponenten hat sich der Fokus mittlerweile immer mehr auf die Anwendung niedrigmolekularer und damit weniger komplexer zellbindender Liganden



verschoben. Hierbei werden beispielsweise synthetische Oligopeptide mit auf den EZM-Proteinen basierenden funktionellen Domänen verwendet. [62, 63]



**Abbildung 2.** Schematische Übersicht der ligandenbasierten Strategien zur Verbesserung der Endothelialisierung von Biomaterialoberflächen.

Zu diesen zellerkennenden Peptidmotiven gehören Integrin bindende Zelladhäsionspeptide wie RGD (Arg-Gly-Asp) und das Laminin nachahmende YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) bzw. mit weiteren Aminosäuren optimierte Derivate derartiger Motive. Der große Vorteil dieser Liganden liegt klar in ihrem niedrigen Molekulargewicht und der damit verbundenen geringeren Komplexität und Variabilität als auch der hohen Stabilität gegenüber Degradation oder konformelle Änderungen. Durch ihre geringe Größe kann ihre Dichte auf einer Oberfläche sehr viel höher sein und durch ihre Spezialisierung auf ein Erkennungsmotiv ist eine zellselektive Interaktion möglich. [61] Darüber hinaus ist eine Erweiterung und Optimierung der Peptidsequenz, bezogen auf die jeweilige Anwendung, ohne Probleme realisierbar. Die Funktionalisierung von Biomaterialoberflächen erfolgt bei diesen Liganden in der Regel mittels kovalenter Immobilisierung, da die Oligopeptide auf die Zellbindung spezialisiert sind und anders als EZM-Makromoleküle keine weiteren Valenzen für ausgeprägte physikalische Interaktionen aufweisen. Durch den Einsatz dieser Liganden zeigen sich deutliche Verbesserungen bei der Endothelialisierung intrakoronarer Stents, jedoch sind sie nicht spezifisch für Endothelzellen bzw. deren Progenitorzellen, was sich auf die *in situ* Endothelialisierung problematisch auswirkt. Thrombozyten können beispielsweise ebenso Integrin vermittelt an RGD binden und bedecken allein durch ihre große Anzahl im Blut mitunter schneller die beschichtete Implantatoberfläche, als es zirkulierende EPCs vermögen. [64]

Einen Schritt weiter geht die Strategie zur zellselektiven Rekrutierung von ECs bzw. EPCs an die biofunktionalisierte Implantatoberfläche, welche zuvor mit zellselektiven Liganden beschichtet wurde. Diese Liganden können in Form von monoklonalen Antikörpern, Peptiden oder Aptameren

selektiv gegen Oberflächenmarker von Endothel- bzw. deren Progenitorzellen gerichtet sein. [65] Die in diesem Feld wichtigsten Entwicklungen sind, dass bereits mit verschiedenen Liganden versucht wurde EPCs selektiv an intrakoronare Stents zu binden. Aoki *et al.* führten im Jahr 2005 klinische Humanstudien mit CD34-spezifischen Antikörpern beschichteten Stents durch. [66] Diese zeigten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer vollständigen Endothelialisierung, so dass derartig beschichtete Stents seit 2009 kommerziell erhältlich sind. [67] Allerdings zeigten längerfristige klinische Studien ein erhöhtes Risiko von In-Stent Restenosen begründet durch neointimale Hyperplasie. [68] Als Ursache dafür wurde der verwendete CD34 Ligand diskutiert. CD34 ist als Oberflächenmarker nicht spezifisch für EPCs, sondern wird ebenso auf anderen pluripotenten Stammzellen exprimiert, welche die Fähigkeit besitzen, in glatte Muskel- oder inflammatorische Zellen zu differenzieren. [69] Hinzu kommt, dass EPCs nur einen geringen Teil der CD34 positiven Zellpopulation im peripheren Blut ausmachen. Dies heißt im Umkehrschluss, dass ein Großteil der rekrutierten Zellen möglicherweise nicht aus EPCs bestand, was die beobachteten Ergebnisse erklären würde.

Eine Strategie für eine spezifischere Zellrekrutierung ist die Generierung von Liganden durch Screening kombinatorischer Peptid- oder Nukleinsäurebibliotheken. (*in vitro* Selektion mittels Phage Display oder SELEX; engl.: *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) Studien mit einem derartig generierten Peptid, welches kovalent an eine Methacrylatmatrix gebunden wurde, zeigten eine verbesserte Endothelialisierung von aus menschlichem Blut gewonnenen Endothelzellen (HBOEC, engl.: *human blood outgrowth endothelial cell/s*) im Vergleich zu Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC, engl.: *human umbilical vein endothelial cell/s*). [70] Die Resultate dieser Studie müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da zum einen Zellen unterschiedlicher Herkunft miteinander verglichen wurden und eine verbesserte Endothelialisierung lediglich unter serumfreien *in vitro* Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Funktion des kovalent gebundenen zellbindenden Liganden durch Adsorption von sowie Interaktion mit Plasmaproteinen inhibiert wurde. Ähnlich den mittels Phage Display generierten Peptiden wird momentan intensiv an der Generierung zellselektiver Aptamere für eine Endothelialisierung geforscht. Bezüglich einer Beschichtung von Stents mit Aptameren wurden von Hoffmann *et al.* im Jahre 2008 im Rahmen einer Zell-SELEX Aptamere gegen CD31 (PECAM-1) generiert, die selektiv porcine EPCs erkennen und aus anti-koaguliertem Vollblut rekrutieren können. [71] In einer nachfolgenden Tierversuchsstudie an Schweinen wurden diese Aptamere auf mit Aminoparylen beschichteten Koronarstents kovalent immobilisiert und hinsichtlich einer verbesserten Endothelialisierung sowie der Gefäßheilung mit Kobalt-Chrom Stents und solchen die nur mit der Trägermatrix beschichtet waren verglichen. Als Resultat konnte kein positiver Effekt der Aptamer-beschichteten Stents in Hinsicht auf die neointimale Proliferation, den späten Lumenverlust und die Restenose erzielt werden. [72]

Ein völlig anderes, jedoch nicht weniger innovatives Konzept für die Besiedlung von künstlichen, wenig benetzbaren Implantatoberflächen wie PTFE, PE oder Silikon mit Endothelzellen, ist die Beschichtung des Materials mit Polydopaminderivaten, welche den Adhäsionsmechanismus von Muscheln imitieren und theoretisch an jeglicher Oberfläche stabil anhaften. [73] Der Anheftung von Muscheln an annähernd jegliche Oberfläche liegt das Bindungsmotiv des Muscheladsorptionsproteins Mefp-5 zugrunde, welches große Mengen Katecholamin (~40%) beinhaltet und sich

durch viele exponierte Funktionalitäten von 2',3'-Phenoxyphenylalanin (DOPA) und Lysin ausgezeichnet. [74, 75] Praktisch genutzte Beschichtungen imitieren das DOPA-Lysin-Motiv durch Verwendung von Dopamin bzw. Epinephrin in Verbindung mit Lysin. Durch Polymerisation unter alkalischen Bedingungen (pH 8,5) bildet sich an der Materialoberfläche ein Makromolekül, welches über multivalente physikalische Wechselwirkungen mit der Matrix in Kontakt steht. Ebenso weist die Beschichtung viele Funktionalitäten wie -OH und -NH<sub>2</sub> Gruppen als auch aromatische Systeme auf. [76] Diese adaptierten Muscheladhäsive zeigen *in vitro* gute Ergebnisse bei der Besiedlung künstlicher Implantatmaterialien mit Endothelzellen, besitzen jedoch die Schwachstelle, dass ähnlich wie bei den makromolekularen EZM-Komponenten keine selektive Erkennung von Endothelzellen möglich ist. [77, 78]

Anhand der vorgestellten Studien zeigt sich, dass sich die Entwicklung bei der Endothelialisierung artifizierender Implantatoberflächen immer mehr in Richtung einer Beschichtung mit niedermolekularen und für die Zellrekrutierung sowie -selektivität optimierten Liganden bewegt. Dennoch steht bis heute kein ausreichend selektiver Ligand für die Rekrutierung von ECs bzw. EPCs zur Verfügung. Von allen genannten Methoden besitzen momentan lediglich solche das Potential eine zellselektive Rekrutierung zwecks Endothelialisierung zu erreichen, die eine auf Multivalenz basierende Generierung selektiv bindender Liganden durch Anreicherung und Isolierung aus kombinatorischen Bibliotheken (Phage Display und SELEX-Technologie) erlauben. Dafür müssen jedoch die genannten Limitationen hinsichtlich Stabilität der Funktionalisierung, biologischer Aktivität sowie der Interferenz mit anderen Zelltypen und Plasmaproteinen beseitigt werden.

### **1.6. Funktionalisierung polymerer Oberflächen mit endothelialisierungsfördernden Liganden**

Da die Oberflächeneigenschaften eines gewählten Biomaterials meist nicht allen Anforderungen für die beabsichtigte Anwendung entsprechen, ist nicht selten die Einführung von Funktionalitäten oder, wie bereits bei der Liganden vermittelten Endothelialisierung beschrieben, weiteren bioaktiven Komponenten eine bewährte Strategie zur Anpassung der Grenzflächeneigenschaften. [40, 79, 80] In manchen Fällen ist die Anpassung der Oberfläche des Substrates durch Generierung von Funktionalitäten bereits ausreichend, um zufriedenstellende Ergebnisse in der geplanten Anwendung zu erhalten. Als Beispiel ist hierbei die Einführung von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen an Polystyroloberflächen durch Behandlung mit Sauerstoffplasma zu nennen. [40, 80] Dabei wird die Polymeroberfläche hydrophiler, wodurch sich die Zelladhärenz deutlich verbessert. Dieses so funktionalisierte Material findet heutzutage in der Zellkultur breite Anwendung.

Allgemein lassen sich Funktionalitäten durch nasschemische Verfahren, Behandlung mit ionisierten Gasen (z.B. Plasmabehandlung) oder Bestrahlung mit hochenergetischen elektromagnetischen Wellen generieren. [59] Jede Methode besitzt dabei gewisse Vor- und Nachteile, deren Relevanz von der spezifischen Anwendung als auch dem jeweiligen Material abhängt. Nasschemische Verfahren benötigen keine aufwendige Ausrüstung und erlauben eine Funktionalisierung bei porösen Materialien bis tief unter die Oberfläche. [81] Dies bringt den Nachteil mit sich, dass die Entfernung toxischer Substanzen (z.B. Lösungsmittel) mitunter aufwendig ist. Demgegenüber entstehen bei einer Plasmabehandlung keine Abfallstoffe. Jedoch ist diese Methode technisch aufwendiger

und die effektive Eindringtiefe beträgt nur wenige Nanometer. [80, 82] Durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen im ultravioletten Bereich lassen sich ebenfalls funktionelle Gruppen auf Biomaterialoberflächen induzieren. [83] Die Eindringtiefe lässt sich dabei durch Anpassung der Wellenlänge und somit des materialspezifischen Absorptionskoeffizienten variieren. [80] Es ist zu beachten, dass viele kommerziell erhältliche Polymere eine inerte Oberfläche aufweisen, was mitunter die Verwendung teils harscher Bedingungen, nicht-biokompatibler Reagenzien oder genannter hochenergetischer Verfahren nötig macht. Diese können eine Veränderung der Oberflächenchemie nach sich ziehen, welche gewünschte physikalisch-chemische Eigenschaften verändert. Zum Beispiel können als Folge einer chemischen Modifizierung äußere Polymerketten durch Interaktion mit hochaktiven Reaktanten wie Radikalen oder Ionen degradieren und dabei die Oberflächeneigenschaften verändern. [84] Ebenso können reaktive Gruppen an der Polymeroberfläche zurückbleiben, welche erst über längere Zeit hinweg abreagieren. Dieser Effekt wird allgemein hin als Alterung bezeichnet. [85] Alterungseffekte beinhalten oftmals Oxidationsreaktionen oder Adsorption von Kontaminationen mit dem Bestreben, an der Oberfläche einen energetisch günstigeren Zustand zu erreichen.

Ist die Generierung von Oberflächenfunktionalitäten auf dem verwendeten Substrat nicht ausreichend oder spezifisch genug für die geplante Anwendung, kann dies in vielen Fällen durch die Einführung zusätzlicher bioaktiver Moleküle erreicht werden. [59] Grundlegend unterscheidet man zwei Methoden für deren Immobilisierung auf polymeren Oberflächen. Die kovalente Anbindung einer gewünschten bioaktiven Komponente an teils zuvor durch die oben genannten Verfahren eingeführte Funktionalitäten auf der Biomaterialoberfläche oder die nicht-kovalente Anbindung durch passive Adsorption. Bei der kovalenten Immobilisierung bioaktiver Moleküle müssen die funktionellen Gruppen der Polymeroberfläche und die der zu bindenden Komponente miteinander kompatibel sein. Üblicherweise bestehen diese Funktionalitäten aus Thiol-, Aldehyd-, Carboxyl-, Hydroxyl- oder primären Aminogruppen. Ebenso ist zu bedenken, dass die biologische Aktivität mitunter stark verändert sein kann. Dies kann zum Beispiel in sterischen Behinderungen als auch in energetischen oder durch das Lösungsmittel vermittelten Veränderungen in unmittelbarer Nähe zur Polymeroberfläche begründet liegen. [86] Zur Lösung dieses Problems ist es manchmal sinnvoll, vor der eigentlichen Immobilisierung des Biomoleküls ein anderes Molekül (z.B. PEG) als Abstandhalter an die Polymeroberfläche anzubinden. Als weiterer Nachteil beinhaltet eine kovalente Funktionalisierung nach wie vor die bereits oben genannten Risiken einer Alterierung der Matrixoberfläche. Alle genannten Faktoren können sowohl die biologische Effektivität als auch die Stabilität gebundener Liganden beeinflussen und somit zu Inflammation oder Verlust der Zelladhärenz führen. [87] In beiden Fällen wäre das Versagen eines Implantats vorprogrammiert. [88, 89] Hinzu kommt, dass manche Biomaterialien nach bestimmten Formen ihrer Prozessierung nur schwer für eine Oberflächenfunktionalisierung zugänglich sind oder keine geeigneten Funktionalitäten aufweisen.

Für diese Materialien bzw. Materialformen bietet sich eine nicht-kovalente Funktionalisierung an. Hierbei wird das gewünschte Biomolekül durch nicht-kovalente Adsorption an die Materialoberfläche gebunden, wobei jegliche Form physikalischer Interaktionen zur Stabilisierung der Moleküle beitragen können. (vgl. 1.7.3.) Das Zusammenspiel und die Stärke dieser Interaktionen sind essentiell von den chemischen Eigenschaften der Polymeroberfläche und den Valenzen der bio-

aktiven Komponente abhängig. Da nicht-kovalente Interaktionen energetisch deutlich schwächer sind als kovalente, kann eine stabile Funktionalisierung nur durch die Summierung einer Vielzahl interagierender Valenzen nach dem Prinzip der Multivalenz erreicht werden. Beispiele für sehr ausgeprägte und spezifische physikalische Interaktionen sind die WW zwischen Biotin und Streptavidin oder die Erkennung und Bindung von Epitopen durch Antikörper. [90] Hinsichtlich der rein physikalischen Oberflächenfunktionalisierung von Biomaterialien für eine verbesserte Endothelialisierung wurde sich bisher die Adsorption von Makromolekülen der EZM zunutze gemacht. Die Interaktionen dieser Moleküle mit der Materialoberfläche sind dabei relativ unspezifisch und beruhen vornehmlich auf attraktiven elektrostatischen Kräften. [50, 58] Hierbei besitzt die Matrix in der Regel partiell oder vollständig gegenteilig geladene funktionelle Gruppen. Derartige Beschichtungen sind daher meist nur für Liganden mit hohem Molekulargewicht und/oder vielen gegenteiligen Ladungen bzw. Partialladungen geeignet. Auf dem Material müssen wiederum ausreichend passende Funktionalitäten für eine ausgeprägte Interaktion vorhanden sein.

Bis dato galten rein physikalische Oberflächenfunktionalisierungen mit bioaktiven Molekülen als nicht robust genug, um in biologischen Fluiden über einen längeren Zeitraum zu bestehen. Bioaktive Oberflächenmodifizierungen können unter physiologischen Bedingungen zum Teil leicht durch Verdrängung und/oder Überlagerung von unspezifisch adsorbierten Plasmaproteinen destabilisiert werden. [23, 70, 91] Darüber hinaus besteht bei der Immobilisierung weniger Kontrolle hinsichtlich der Orientierung, Dichte und Verteilung. Dennoch zeigten sich bereits in mehreren Studien klare Vorteile im Vergleich zu einer kovalenten Anbindung. Abgesehen von der Beibehaltung gewünschter Matrixeigenschaften wurden beispielsweise durch die reine Adsorption von Heparin an mit Allylamin beschichtetem 316S Stahl Verbesserungen der biologischen Aktivität nachgewiesen, was sich positiv auf die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auswirkte. [49, 50] Das gleiche Resultat war bei der Immobilisierung von Kollagen auf einer PLLA-PMMA-Matrix zu erkennen. Hierbei wurde Kollagen zunächst kovalent gebunden und anschließend eine weitere Schicht Kollagen rein physikalisch adsorbiert. [56] Der gegenteilige Effekt zeigte sich durch Immobilisierung von Kollagen auf 316S Stahl, bei der Kollagen zunächst physikalisch adsorbiert und anschließend mittels EDC quervernetzt wurde. Die Stabilität dieser Funktionalisierung war nachweislich erhöht, jedoch nahm ebenso mit steigender Quervernetzung die Biokompatibilität ab. [57] Als Kernaussage kann aus den bisherigen Betrachtungen geschlussfolgert werden, dass umso mehr man mittels kovalenter chemischer Stabilisierung eingreift, desto robuster ist zwar die Funktionalisierung, aber umso schlechter fällt in der Regel die Biokompatibilität aus. Die Gründe hierfür liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der immer weniger nativen Umgebung, welche den Endothelzellen als Substrat angeboten wird.

Für niedermolekulare Liganden wie zellselektiv bindende Antikörper, Peptide und Aptamere ist die Funktionalisierung auf rein physikalischem Weg jedoch bis dato nicht praktikabel. Sie sind für ihre Aufgabe maßgeschneidert und verfügen somit nicht über eine ausreichende Anzahl zusätzlicher Valenzen, um eine stabile physikalische Interaktion mit Materialoberflächen aufbauen zu können. Erste Studien für eine spezifischere Ausnutzung physikalischer Interaktionen, um in deren Summe eine stabile Oberflächenfunktionalisierung zu erreichen, wurden durch Modifizierung zellbindender Peptide mit hydrophilen Domänen oder amphiphilen Peptiden durchgeführt. [23, 92] Die Liganden ordneten sich in wässriger Umgebung eigenständig als

Monoschicht an (sog. SAMs; engl.: *self assembled monolayer*), wobei die Interaktion mit dem Substrat nach dem gleichen Prinzip wie bei den EZM-Makromolekülen primär über elektrostatische Interaktionen vermittelt wurde. Diese Form der Oberflächenmodifizierung basierte erneut primär auf der Ausnutzung nur einer physikalischen Interaktionsmöglichkeit und zeigte keine optimale Ausnutzung aller möglichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Darüber hinaus mussten durch eine gegenteilige (Partial)ladung erneut bestimmte Bedingungen an der Materialoberfläche erfüllt sein, um eine ausreichende Interaktion zu ermöglichen.

Für eine effektive und stabile physikalische Oberflächenbeschichtung mit den genannten zellbindenden Molekülen wären ähnlich optimiert an das Substrat bindende niedermolekulare Liganden sinnvoll. Diese sollten in der Lage sein, alle zur Verfügung stehenden Möglichkeiten physikalischer Interaktion mit der Materialoberfläche optimal auszunutzen, um in ihrer Summe mit hoher Affinität an die Matrix binden zu können. Da sich Voraussagen über die exakte chemische Zusammensetzung solcher Liganden, welche als interaktionsoptimiertes Pendant der angebotenen Matrixoberfläche wirken sehr schwierig gestalten, sind Screeningstrategien für deren Generierung am besten geeignet. Durch Methoden der *in vitro* Selektion können passende Liganden aus kombinatorischen Bibliotheken von Peptiden oder Oligonukleotiden gesucht werden. Diese Methoden erlauben eine solch hohe Diversität von Molekülen innerhalb einer Bibliothek, dass nach dem Prinzip der Multivalenz optimiert bindende Liganden für theoretisch jedes Substrat generiert werden können. Die Generierung von multivalent bindenden Peptidliganden gegen eine polymere Oberfläche und deren Einsatz für die nicht-kovalente Oberflächenfunktionalisierung konnte bereits demonstriert werden. [93] Dennoch zeigten sich Probleme bei einer weiteren biotinvermittelten Immobilisierung von Streptavidin an das Material gebundene Peptid. Als Begründung wurden denaturierende Interaktionen zwischen Polymeroberfläche und Peptid sowie Aggregation der Peptide bei der Verwendung höherer Konzentrationen benannt, welche die Zugänglichkeit von Biotin für Streptavidin verringerten. Zur Anwendung einer Nukleinsäure basierten *in vitro* Selektionsstrategie für die Generierung optimiert bindender Aptamere an Biomaterialoberflächen liegen bisher keine Daten vor. Dennoch wäre eine solche Strategie durchaus erfolgversprechend, da sie Peptid basierten Methoden in einigen Aspekten klar überlegen ist.

### 1.7. Modell zur Generierung DNS-basierter Liganden gegen polymere Oberflächen

#### *Auswahl einer DNS-basierten Ligandengenerierung (SELEX)*

Für das in diesem Promotionsprojekt beschriebene Modellsystem zur Generierung von interaktionsoptimierten Liganden gegen polymere Oberflächen wurde eine auf Nukleinsäuren und im Speziellen auf DNS basierende *in vitro* Selektionsstrategie (SELEX) ausgewählt. Die Gründe dafür lagen in der deutlich höheren Diversität von auf Nukleinsäuren basierenden kombinatorischen Bibliotheken gegenüber vergleichbaren Peptid basierten Verfahren wie Phage Display. (statistisch  $\sim 10^9$  unterschiedliche Peptide im Vergleich zu  $\sim 10^{15}$  Aptamerkandidaten bei Nukleinsäuren [94, 95]) Ebenso können einzelsträngige Oligonukleotide im Vergleich zu Peptiden gleicher Sequenzlänge eine weit höhere Anzahl thermodynamisch stabiler Strukturvarianten einnehmen. [94] Darüber hinaus war das Risiko einer späteren ungewollten Reaktion des biologischen Systems durch Verwendung von Nukleinsäuren deutlich geringer. Wie bereits ausführlich

beschrieben wurde, erfolgt die natürliche EZM-vermittelte Zellerkennung meist anhand relativ kurzer Peptidmotive. (RGD, YIGSR etc.) Die Möglichkeit der Anreicherung eines dieser oder sehr ähnlicher Bindungsmotive im Rahmen eines Peptid-basierten Screenings nach Material bindenden Liganden wäre daher gegeben. Von Aptameren sind bisher keine immunologischen Reaktionen biologischer Systeme bekannt. Ebenso erfolgt die Zellerkennung und interzelluläre Kommunikation auf Peptid- bzw. Proteinebene. Von daher waren zellbiologische oder interferierende Reaktionen durch Nukleinsäure-basierte Liganden sehr viel weniger wahrscheinlich.

### ***Kriterien für die Materialauswahl***

Für die Auswahl eines geeigneten polymeren Materials, welches eine auf mehreren physikalischen Wechselwirkungen basierende optimierte multivalente Interaktion mit DNS-Basen zulässt, lassen sich klare Anforderungen formulieren. Dabei wurde den chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der Oberflächenchemie und -ladung sowie der Topographie eines potenziellen Materials besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da diese Eigenschaften das Verhalten adsorbierender Moleküle an der Phasengrenze entscheidend beeinflussen. [23, 96]

Das polymere Biomaterial sollte, in Anlehnung an die prominentesten nicht-kovalenten Interaktionsmöglichkeiten von Nukleinsäurebasen, primär fähig sein, Wasserstoffbrückenbindungen als auch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen eingehen zu können. Somit musste das Polymer an seiner Oberfläche über delokalisierte  $\pi$ -Systeme als auch Funktionalitäten verfügen, welche als H-Brücken Donor bzw. Akzeptor fungieren können. Unter physiologischen Bedingungen positiv und partial positiv als auch negativ geladene Funktionalitäten sollten nicht vorhanden sein, um eine zu starke elektrostatische Anziehung bzw. Repulsion durch Interaktion mit dem polyanionischen DNS-Phosphatrückgrat zu vermeiden. Letztere Eigenschaften wären für die auf Selektion beruhende Generierung bindender Aptamere hinderlich, da sich die Interaktion der DNS-Moleküle mit der Matrixoberfläche primär durch ein allgemeines Strukturmerkmal definieren würde und nicht durch selektive Interaktionen der Nukleinsäurebasen mit der Polymeroberfläche. Abgesehen von bestimmten Voraussetzungen der chemischen Struktur waren ebenso weitere physikalisch-chemische Grenzflächeneigenschaften von entscheidender Bedeutung. So sollte sich die Oberflächenrauigkeit des Polymers in einer zu den gefalteten Aptameren vergleichbaren Größenordnung von wenigen Nanometern bewegen, um damit eine ausgeprägtere Interaktion zu ermöglichen. [97, 98] Hinsichtlich makroskopischer Eigenschaften wie der Benetzbarkeit wäre eine hydrophobe Oberfläche von Vorteil, um die Interaktion der ebenfalls vergleichsweise hydrophoben Nukleinsäurebasen mit der Polymeroberfläche energetisch zu begünstigen und eine basenspezifische Selektion bindender Liganden zu forcieren.

### ***Auswahl des Modellpolymers***

Unter Beachtung der oben genannten Kriterien wurde eine Vielzahl möglicher polymerer Biomaterialien für das Modell in Betracht gezogen. Als ein ideales Modellpolymer sowohl für die Generierung multivalent bindender DNS-Aptamere als auch für eine spätere auf diesen Aptameren basierende unterstützte Endothelialisierung wurde Polyetherimid (PEI) ausgewählt. (vgl. 1.7.2.) PEI bietet aufgrund seiner chemischen Struktur eine Vielzahl von Valenzen, um ausgeprägte

physikalische Wechselwirkungen mit DNS-Basen eingehen zu können. (Abbildung 5) Es besitzt einen hochgradig aromatischen Charakter mit einer Vielzahl delocalisierter  $\pi$ -Systeme für Interaktionen nach dem Vorbild der Basenstapelung. Ebenso weist jede Wiederholungseinheit des Polymers multiple Carbonylgruppen und Etherbrücken auf, deren Sauerstoffe durch ihre hohe Elektronegativität und freien Elektronenpaare als Protonenakzeptoren bei der Ausbildung von H-Brücken als auch für direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen dienen können. Gleichzeitig wirken die Substituenten der meisten aromatischen Systeme elektronenziehend, so dass die Ladungsdichte der  $\pi$ -Elektronenwolken verringert wird und somit durch die verringerte Repulsion  $\pi$ - $\pi$ - bzw.  $\pi$ - $\sigma$ -Interaktionen unterstützt sind. [99, 100] (vgl. 1.7.3.) Im Vergleich zu diesem Polymer zeigten sich etablierte Materialien für kardiovaskuläre Anwendungen wie PET und PTFE als weniger gut für das Modellsystem geeignet, da sie entweder nicht die genannten chemischen Voraussetzungen erfüllten und deutlich weniger Valenzen für die Ausbildung multivalenter Interaktionen wie H-Brücken bzw. stärker repulsierende  $\pi$ -Systeme aufwiesen. PEI erfüllte ebenso die gestellten Anforderungen in Hinsicht auf die Oberflächenrauigkeit, da diese sich durch eine geeignete Prozessierung im Nanometerbereich bewegte. Hierzu wurde PEI für das Modellsystem in Form von glatten Filmen verwendet. [42] Auch die Hydrophobizität zur Forcierung einer von den Nukleotidbasen abhängigen Selektion bindender Aptamerkandidaten war durch den ausgeprägten aromatischen Charakter des PEI gegeben.

### 1.7.1. Aptamere

Aptamere sind kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (typischerweise < 100 bp) bestehend aus DNS oder RNS, welche auf Grundlage ihrer Basensequenz die Fähigkeit besitzen, komplexe dreidimensionale Strukturen einzunehmen. [101, 102] Diese für Aptamere einzigartige Konformation ermöglicht die Bindung an dessen korrespondierende/s Zielmolekül oder -struktur mit hoher Affinität und Selektivität. [103] Generiert werden Aptamere aus synthetisch hergestellten kombinatorischen Oligonukleotidbibliotheken mit hoher Diversität durch ein sich an den Prinzipien der Evolution orientierendes Verfahren der Selektion und Amplifikation bindender Aptamerfraktionen innerhalb der Bibliothek. Für diese Methode wurde 1990 von Tuerk und Gold *et al.* der Name der SELEX geprägt, mit der es ihnen gelang durch das Screening großer Oligonukleotidbibliotheken einen RNS-Liganden gegen die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 zu isolieren. [104] Im gleichen Jahr wurde auch erstmals der Begriff der Aptamere begründet, nachdem Ellington und Szostak *et al.* bindende RNS-Oligonukleotide gegen verschiedene organische Farbstoffe generieren konnten. [101] Der Begriff des Aptamers leitete sich hierbei aus dem lateinischen Wort „*aptus*“ für passend und dem griechischen „*meros*“ für Teil her.

Aus chemischer Sicht sind Aptamere heteropolymere Makromoleküle, deren Monomere die Nukleotide darstellen, welche über Phosphatesterbindungen in einem alternierenden Muster aus Einfachzuckern und Phosphatsäureestern miteinander verknüpft sind. Durch die repetitive Anordnung alternierender Phosphat- und Ribosegruppen sowie der stets gleichen Orientierung der Phosphodiesterbindungen entsteht ein polyanionisches Polymer, dessen hydrophobe Basen als Verzweigungen im 90° Winkel vom negativ geladenen Rückgrat weg ausgerichtet sind. Die unterschiedlichen Nukleinsäurebasen sind der Grund für die hohe Variabilität des genetischen Codes. Die Basen sind hierbei Derivate der Purine bzw. Pyrimidine, wobei in DNS die beiden



Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) vorkommen. Der Unterschied bei der RNS besteht im Vorkommen von Uracil (U) an Stelle von Thymin. Alle Basen sind planare heterozyklische Systeme mit konjugiertem  $\pi$ -Elektronensystem. Mit Hilfe der vier Basen als Grundbausteine des genetischen Materials können immense Mengen an Informationen gespeichert werden. Beispielsweise gibt es für einen DNS-Doppelstrang bestehend aus 20 Basenpaaren  $4^{20}$  (ca.  $1,1 \cdot 10^{12}$ ) unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten. Führt man sich die geschätzte Größe des menschlichen Genoms mit etwa  $2,91 \cdot 10^9$  Basenpaaren [105] vor Augen, so sind die Kombinationsmöglichkeiten und somit die Menge an gespeicherter Information astronomisch.

Einzelsträngige Oligonukleotide besitzen die außergewöhnliche Eigenschaft eine Vielzahl thermodynamisch stabiler Motive sowohl in der Sekundär-, als auch der Tertiär- und Quartärstruktur einnehmen zu können. [95] Die Grundlage für die Stabilität dieser Konformationen und damit auch der Bindung an ein Zielmolekül basiert auf einer Vielzahl nicht-kovalenter physikalischer Interaktionsmöglichkeiten der Nukleinsäurebasen. Als Grundmechanismen sind hierbei allem voran Dipol-Dipol-WW (H-Brücken) sowie hydrophobe  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen der heterozyklischen Basenringssysteme zu nennen. Diese möglichen Wechselwirkungen erlauben bei den Nukleinsäuren die Ausbildung einer weit höheren Anzahl thermodynamisch stabiler Strukturvarianten, als es beispielsweise bei einem Peptid gleicher Sequenzlänge möglich ist. [94]

Das Zustandekommen der Aptamerbindung an sein jeweiliges Zielmolekül beruht stets auf einer Kombination verschiedener nicht-kovalenter Wechselwirkungen, welche in der Summe für die hohe Affinität und Spezifität verantwortlich sind. (Multivalenz) Zu diesen rein physikalischen Interaktionen zählen „schwache“ Wechselwirkungen wie Dipol-Dipol- und vdW- als auch durch Ionen vermittelte und hydrophobe Interaktionen, welche sich meist in der Stabilisierung durch H-Brücken und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen äußern. [106, 107] Die Stärke der Bindung zwischen einem generierten Aptamer und seinem korrespondierenden Bindungspartner bewegt sich meist bei Affinitäten mit Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren bis hinunter in den picomolaren Bereich. [108, 109] Hierbei ist die Bindung zum Zielmolekül zumeist hochspezifisch, so dass Aptamere bereits geringste Unterschiede beim Bindungspartner, wie zum Beispiel die Veränderung einer Methyl- [108] oder Hydroxylgruppe [110] sowie wahlweise das D- und L-Enantiomer unterscheiden können. [111] Der hohe Grad an Selektivität und Bindungsstärke macht Aptamere in dieser Hinsicht vergleichbar und in manchen Fällen sogar besser als Antikörper, welche bereits seit langem in der Diagnostik etabliert sind. [108]

Für die Auswahl der aptameren Zielstrukturen gibt es theoretisch keine Beschränkungen. Aufgrund der hohen Flexibilität sowie der Diversität der Nukleinsäurebibliotheken können interaktionsoptimierte Liganden gegen jedes denkbare Molekül generiert werden. Bis dato wurden bereits eine Vielzahl von Aptameren gegen verschiedenste Zielstrukturen entwickelt. Dazu gehören Antibiotika [112], Aminosäuren und Peptide [111, 113], sowie größere Proteine wie Enzyme [114], Antikörper [115], Wachstumsfaktoren [116] und Zelladhäsionsmoleküle. [117] Selbst gegen komplexe Zielstrukturen wie ganze Zellen [118, 119], bei denen teilweise die bindenden Epitope nicht vollständig verstanden sind, wurden Aptamere isoliert. Limitierend bei der Auswahl der Zielstruktur ist jedoch nach wie vor die begrenzte Zellmembranpermeabilität der

Aptamere, so dass im biologischen Bereich bis heute meist extrazelluläre Strukturen zur Aptamer-generierung ausgewählt wurden. Ebenso liegen bis heute keine Daten über eine gezielte Aptamer-generierung gegen Polymere oder andere Festkörperoberflächen vor.

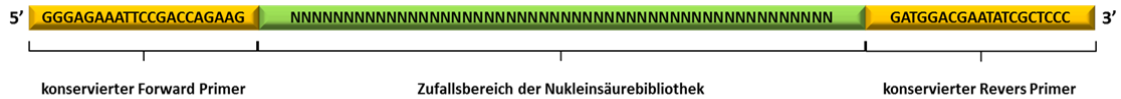
Die möglichen Einsatzgebiete der Aptamere sind vielfältig und reichen für die Anwendung als molekulare Werkzeuge von der Biotechnologie und Medizin, über die Zell- und Mikrobiologie, bis hin zur Chemie. In einem ihrer Hauptanwendungsgebiete der Therapeutik wird intensiv daran geforscht, sich das Zell- bzw. Gewebetargeting der Aptamere in Kombination mit polymeren Wirkstofffreisetzungssystemen zu Nutze zu machen, um diese beispielsweise in der Tumorbehandlung einzusetzen. [120] Diese Art der zielspezifischen Aptamerdetektion findet auch in der Diagnostik und Analytik Anwendung. Hierbei besitzen beispielsweise Fluoreszenz markierte Aptamere ein enormes Potenzial bei der *in vivo* Bildgebung von pathogenen Zellen und Geweben im Rahmen der Tumorforschung [121] oder der Detektion von Mikroorganismen sowohl im menschlichen Körper als auch in der Lebensmittelindustrie. [122-124]

Ein großer Nachteil von Nukleinsäuren ist ihre begrenzte Stabilität in biologischen Systemen. Besonders *in vivo* werden sie in der Regel durch Nukleasen, wie sie in biologischen Fluiden vorkommen, sehr schnell abgebaut. Dies erschwert den Einsatz von Aptameren im medizinischen und diagnostischen Anwendungsfeld deutlich. [125] Hierbei sind DNS-Aptamere wegen der fehlenden freien Hydroxylgruppe am C2'-Atom weitaus stabiler als vergleichbare RNS-Liganden. [114] Im Resultat verlieren Aptamere *in vivo* meist innerhalb kurzer Zeit ihre Funktionalität. [125] Um die funktionelle Halbwertszeit von Aptameren *in vivo* zu steigern, stehen mehrere effektive Methoden zur Modifizierung von Nukleinsäuren zur Verfügung. Zur Erhöhung der Nukleaseresistenz ist die Verwendung weniger reaktiver Amino- oder O-Methylgruppen in Pyrimidinnukleotiden, artifizierender Nukleotide wie 4'-Thiopyrimidin, blockierter Nukleinsäuren mit einer Sauerstoff-Methylen-Brücke zwischen dem C2'- und dem C4'-Atom der Ribose oder die Modifizierung von Aptameren mit verschiedenen „Kappen“ (invertierte Thymidine, Phosphatreste oder PEG) an ihrem 5'- und/oder 3'-Terminus eine bewährte Strategie zur Verzögerung des enzymatischen Abbaus. [126-130] Eine gänzlich andere Methode der Aptamerstabilisierung stellt die Entwicklung von spezifisch bindenden L-RNA-Aptameren (sog. Spiegelmeren) dar. Bei dieser 1996 von Fürste *et al.* entwickelten Methode wird sich zu Nutze gemacht, dass Enantiomere der korrespondierenden D-Nukleinsäuren (Austausch der D- durch die L-Ribose) durch Nukleasen nicht erkannt werden können und somit eine hohe enzymatische Stabilität besitzen. [131, 132]

### ***Generierung von Aptameren***

Die Generierung eines Aptamers mittels der SELEX-Methode beginnt stets ausgehend von einer durch Festphasensynthese hergestellten kombinatorischen Nukleinsäurebibliothek mit hoher Sequenzdiversität. Jedes Sequenzmotiv innerhalb dieser Bibliothek ist ein lineares Oligomer mit einzigartiger Basensequenz. Jedes dieser Oligomere besteht aus einem zentralen randomisierten Bereich mit einer bestimmten Anzahl variabler Positionen, welcher von zwei konservierten Sequenzen flankiert wird. (Abbildung 3) Die zufällige Basenabfolge im Oligomer bedingt, dass auch jedes Molekül innerhalb der Bibliothek eine unterschiedliche Konformation einnehmen kann, welche unterschiedlich stark ausgeprägte Interaktionen mit einer potenziellen Zielstruktur zulässt.

Bereits aus der Grundstruktur eines solchen Oligomers kann das Funktionsprinzip der SELEX geschlussfolgert werden. Der randomisierte Bereich dient der Selektion bindender Aptamere und die flankierenden konservierten Primersequenzen deren Vermehrung in jeder Selektionsrunde durch Amplifikation mittels PCR. Das entscheidende Kriterium bei der *in vitro* Selektion ist die Diversität der synthetischen Startbibliothek. Theoretisch ergibt sich deren Komplexität aus der Anzahl der Basen des randomisierten Bereiches zur Basis der verfügbaren variablen Nukleinbasen. Bei der in diesem Promotionsprojekt verwendeten Bibliothek mit 50 variablen Positionen entspräche dies theoretisch  $4^{50}$  ( $1,3 \cdot 10^{30}$ ) möglichen Kombinationen. In der Realität werden mittels Festphasensynthese jedoch „lediglich“ Diversitäten in der Größenordnung von  $10^{14}$  -  $10^{15}$  verschiedenen Sequenzmotiven erreicht. [94, 95] Diese Anzahl unterschiedlicher Motive ist dennoch ausreichend, dass das Vorhandensein mindestens eines optimiert bindenden Aptamers gegen jegliche denkbare Zielstruktur angenommen werden kann.



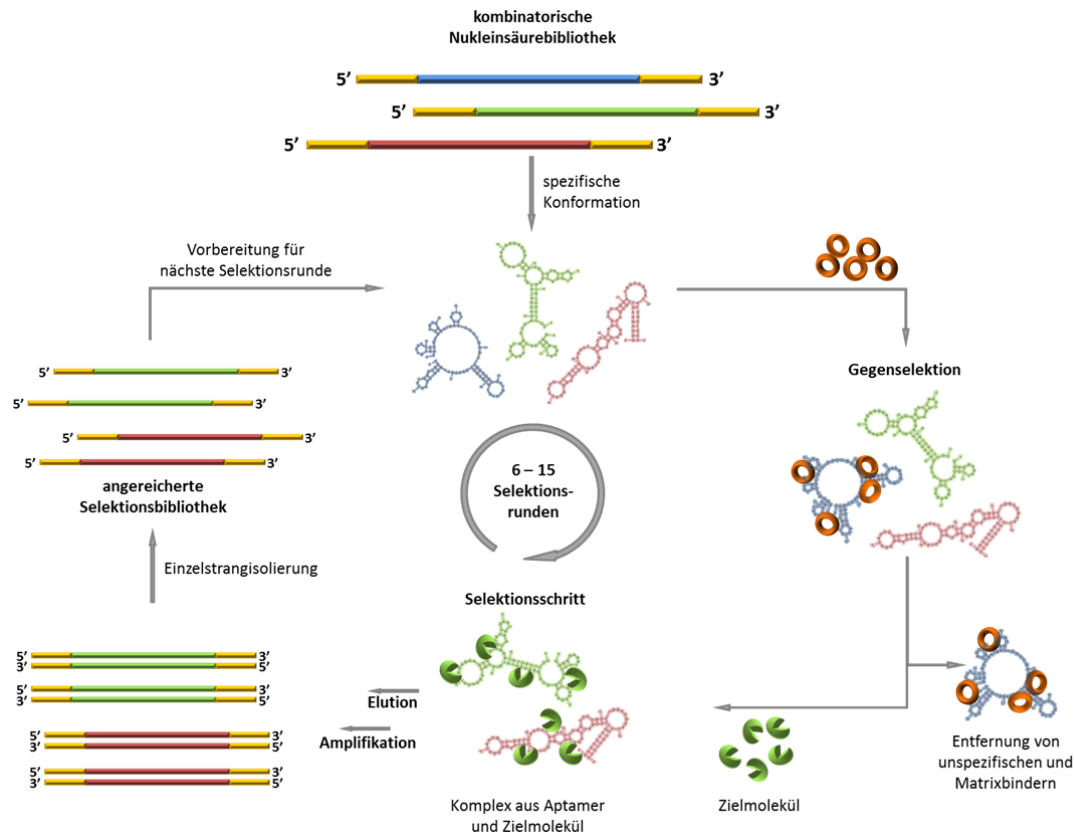
**Abbildung 3. Aufbau der kombinatorischen Nukleinsäurebibliothek.** Der Zufallsbereich, bestehend aus einem 50mer Oligonukleotid mit statistisch zufälliger Basenverteilung (grün), wird von den beiden konservierten Primersequenzen (gelb) flankiert. Die gesamte Bibliothek liegt dabei als Einzelstrang-DNS (ssDNS) vor.

### ***Die in vitro Selektion (SELEX)***

Der Prozess zur Identifizierung von Aptameren beruht im Wesentlichen auf einer *in vitro* Selektion bindender Sequenzen gegen eine bestimmte Zielstruktur und deren Anreicherung innerhalb der Bibliothek durch gezielte Vermehrung, wobei diese Schritte im Rahmen der SELEX zyklisch wiederholt werden. (Abbildung 4) Mit jeder Selektionsrunde verringert sich die Komplexität der Bibliothek und es reichern sich immer mehr bindende Sequenzen an.

Zu Beginn des Selektionsprozesses wird die Startbibliothek mit der Zielstruktur unter klar definierten Bedingungen (pH-Wert, Temperatur etc.) inkubiert. Während dieses Schrittes bindet initial nur ein geringer Teil der Sequenzen an die Zielstruktur. Nicht bindende Sequenzen werden verworfen und lediglich gebundene Oligonukleotide von der Zielstruktur isoliert. Die Form in der die Zielstruktur beim Aptamerbindungsschritt vorliegt, ist dabei von der Auswahl der Trennmethode sowie der Größe und Eigenschaften der Zielstruktur abhängig. Diese kann entweder frei in der Lösung oder immobilisiert auf einer festen Phase vorliegen. Letzteres wird häufiger für niedermolekulare Zielstrukturen angewandt (kovalente Immobilisierung auf Sepharose- oder magnetischen Partikeln [90, 133]), um die Trennung gebundener von nicht gebundenen Nukleinsäuren zu erleichtern. Besitzt die Zielstruktur eine ausreichende Größe, wie es zum Beispiel bei Proteinen, Vesikeln oder Zellen der Fall ist, kann auf eine vorherige Immobilisierung verzichtet werden. Für die Separation dieser Zielstrukturen eignen sich Verfahren wie Ultrafiltration durch Nitrozellulosemembranen [101, 133], Kapillarelektrophorese [134], Durchflusszytometrie [135] oder Zentrifugation. [136] Die effiziente Trennung von gebundenen Komplexen aus Aptamer und Zielstruktur von nicht gebundenen Komponenten ist ein fundamentaler Bestandteil der SELEX.

Ohne diese würde es zur Anreicherung schwach bindender Aptamere kommen und so mit hoher Wahrscheinlichkeit hochaffin bindende Sequenzen aus der Bibliothek verdrängt werden. [137]



**Abbildung 4. Schematische Darstellung des SELEX-Prinzips.** Bei der *in vitro* Selektion werden aus einer kombinatorischen Nukleinsäurebibliothek bindende Aptamere über mehrere Runden aus Selektion und Amplifikation hinweg angereichert und nachfolgend die Sequenzen mittels Sequenzierung aufgeklärt.

Nach erfolgreicher Isolierung der Komplexe aus Aptameren und der Zielstruktur werden diese voneinander getrennt. Dies kann entweder in einem zusätzlichen Arbeitsschritt vor der Vervielfältigung mittels PCR durch die Zugabe denaturierender Substanzen (z.B. Harnstoff, SDS, EDTA) [138] oder direkt im Rahmen der nachfolgenden Amplifikation durch Hitzedenaturierung geschehen. [139] Um die angereicherte Bibliothek für den nächsten Selektionszyklus fertigzustellen, werden im nächsten Schritt die aus dieser Selektionsrunde isolierten Sequenzen vervielfältigt sowie im Fall von DNS Aptameren der *sense* Strang isoliert. Die Isolierung kann durch Biotin-Streptavidin Interaktion im Basischen, Auftrennung im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen oder nukleolytischem Abbau eines phosphorylierten *antisense* Stranges mittels des Enzyms  $\lambda$ -Exonuklease erreicht werden. [140]

Die Effizienz der Anreicherung bindender Aptamere ist während der SELEX stark von der Stringenz der Bindungsbedingungen innerhalb der Selektionsrunden abhängig. Umso höher der Selektionsdruck ist, desto wahrscheinlicher ist die Anreicherung hochaffin bindender Aptamere innerhalb der Bibliothek. Die Stringenz kann hierbei durch Veränderungen im Selektionsprotokoll

wie dem Verhältnis zwischen DNS und angebotener Zielstruktur oder Ausdehnung der Waschschritte gesteigert werden. Ebenso spielt die Gegenselektion eine entscheidende Rolle, um die Anreicherung unselektiv sowie spezifisch an die Selektionsmatrix bindender Aptamere zu verhindern. Zu diesem Zweck wird im Verlauf der *in vitro* Selektion i.d.R. ein Präselektionsschritt vor der eigentlichen Selektion eingeführt. Hierbei werden für Letztere nur jene Sequenzen verwendet, die in der Präselektion nicht an die dort enthaltenen Strukturen gebunden haben.

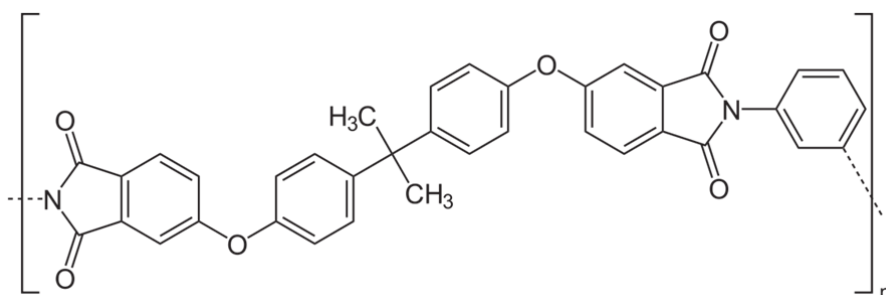
Der iterative Prozess aus Selektion und Amplifikation bindender Sequenzen wird bei der SELEX so lange durchgeführt, bis eine deutlich gesteigerte Bindung im Vergleich zur Startbibliothek erkennbar ist. Dieser Fall tritt in der Regel nach 6 - 15 Zyklen ein. [95] Um den Selektionsfortschritt während der SELEX zu detektieren, stehen je nach der Natur des Zielmoleküls verschiedene Methoden zum quantitativen Nachweis einer Aptamerbindung zur Verfügung. Beispielsweise kann in Bindungsanalysen mit Aptamerfraktionen aus verschiedenen Selektionsrunden der prozentuale Anteil gebundener Sequenzen auf einer zuvor festgelegten Menge der Zielstruktur mittels quantitativer RealTime-PCR (qPCR) verglichen werden. [141]

Am Ende einer *in vitro* Selektion haben sich meist mehrere Bindungsmotive innerhalb der Bibliothek angereichert. Um diese im Einzelnen analysieren zu können, haben sich in den vergangenen Jahren Sequenzierungsmethoden die einen hohen Durchsatz bei geringerem Zeit- und Arbeitsaufwand besitzen immer mehr durchgesetzt. Diese Methoden des *Next Generation Sequencings* (NGS) erlauben eine Sequenzierung angereicherter Bibliotheken ohne vorherige Vereinzelung der Sequenzen. Konnten in der Vergangenheit mittels Klonierung und anschließender Sanger Sequenzierung unter erheblichem Arbeitsaufwand lediglich mehrere hundert Sequenzen isoliert und analysiert werden, ist mit modernen Methoden des NGS die simultane Sequenzierung und Analyse mehrerer Millionen Motive kein Problem mehr. Methoden der Hochdurchsatzsequenzierung benötigen nach wie vor eine initiale Vervielfältigung der DNS, welche im Anschluss in Arrays organisiert wird. Danach werden selektiv die verschiedenen Nukleotide hinzugefügt und ein Einbau bzw. Nichteinbau in den komplementären DNS-Strang durch ein Reportersystem detektiert. Zu den Methoden dieser Generation gehört zum Beispiel das Verfahren der Brückenamplifikation. (Illumina-Sequenzierung) Hierbei wird die zu sequenzierende DNS zunächst in denaturierter Form über DNS-Adaptersequenzen auf einer Trägerplatte fixiert und mittels Brückenamplifikation vervielfältigt. [142, 143] Auf diese Weise entstehen auf dem Trägerchip doppelsträngige DNS-Brücken, aus denen durch weitere Amplifikation viele Millionen dichte Cluster aus einzelnen Sequenzen gebildet werden. Nach Linearisierung beginnt die Sequenzierung durch den Einbau eines der vier schrittweise zugegebenen verschiedenfarbig Fluoreszenz markierten Nukleotide. Der erfolgreiche Einbau eines Nukleotids wird analog zur Sanger-Sequenzierung mittels Laserspektroskopie detektiert und das Fluorophor anschließend entfernt, um den Einbau der nächsten Base in die Sequenz zu ermöglichen. Durch Aneinanderreihung der Fluoreszenzsignale eines Clusters kann am Ende des Sequenzierungslaufes auf die Basensequenz geschlossen werden.

### 1.7.2. Polyetherimid (PEI) als Modellpolymer

Bei dem für das Modellsystem ausgewählten Polymer Polyetherimid handelt es sich um einen Hochleistungsthermoplasten, welcher erstmals im Jahre 1982 von der Firma General Electricals

als PEI-Ultem® 1000 kommerziell vertrieben wurde und anfangs aufgrund seiner hohen Stabilität, Hitze- und Chemikalienbeständigkeit sowie elektroisolierenden Eigenschaften vornehmlich in der Elektronik- und Luftfahrtindustrie zum Einsatz kam.



**Abbildung 5.** Chemische Struktur des technischen Polymers PEI-Ultem® 1000.

Die genannten positiven Eigenschaften dieses amorphen, bernsteinfarbenen Werkstoffes begründen sich aus der chemischen Struktur. (Abbildung 5) Die mittels flexibler Etherbindungen verknüpften Phthalimidgruppen der Polymerkette sind für die besondere thermische und mechanische Belastbarkeit verantwortlich. Deshalb wurde PEI schon vor längerer Zeit als potenzielles Biomaterial für Anwendungen im medizinischen Sektor ins Auge gefasst. PEI lässt sich auf verschiedene Arten prozessieren, so dass unterschiedlichste Formkörper wie zum Beispiel Membranen, Filme oder Partikel, den jeweiligen Anforderungen entsprechend, problemlos aus der Schmelze oder in Kombination mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel aus der Lösung hergestellt werden können. Insbesondere die Möglichkeit einer Dampfsterilisation, ohne dabei die Eigenschaften des Polymers zu verändern ( $T_g = 216 \text{ °C}$ ), stellt einen immensen Vorteil im Vergleich zu vielen anderen polymeren Biomaterialien dar. Die potentiellen medizinischen Anwendungsfelder dieses Materials reichen von Biosensoren bis hin zu unterstützenden Membranen für biohybride Organe.

**Tabelle 1.** Chemische Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften des technischen Polymers PEI-Ultem® 1000. [42]

<b>Summenformel:</b> (Wiederholungseinheit)	$C_{37}H_{24}O_6N_2$	<b>Glasübergangstemperatur:</b>	$T_g = 216 \text{ °C}$ (kein $T_m$ )
<b>molare Masse</b>		<b>E-Modulus (bei 25 °C):</b>	3.200 MPa
– Wiederholungseinheit	592,61 g/mol	<b>Dichte (bei 25 °C):</b>	1,27 g/cm <sup>3</sup>
– Makromolekül	$M_w = 32.800 \text{ g/mol}$ $M_n = 18.000 \text{ g/mol}$	<b>PDI</b>	1,82

Die Untersuchung der Biokompatibilität von Polyimiden und speziell der Interaktion von PEI mit biologischen Systemen steht schon seit längerem im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Bereits zu Beginn der 1980er Jahre wurde der Frage nachgegangen, wie sich humane Zellen im direkten Kontakt zu aromatischen Polyimiden verhalten. Hierbei zeigte sich in ersten *in vitro*

Studien mit humanen Zellen aus dem gingivalen Karzinom, dass Polyimide im Allgemeinen eine verbesserte initiale Adhärenz, jedoch ebenso eine geringere Proliferationsrate im Vergleich zu PET zeigten. [144] Fortgeführt wurden diese Studien in den 1990er Jahren erstmals mit kommerziell erhältlichen hydrophoben Polyimidmembranen (darunter auch PEI) unter Gesichtspunkten wie der Proteinadsorption, Zytotoxizität und Hämokompatibilität im Vergleich zu etablierten Implantatmaterialien wie PTFE und Silikon. PEI-Membranen wiesen hierbei keine nennenswerte Zytotoxizität im direkten Kontakt mit Mausfibroblasten, jedoch erneut eine verringerte Proliferationsrate auf. Weitergehend zeigte PEI eine verhältnismäßig hohe Proteinadsorption sowie eine moderate Thrombogenität. [145, 146] Unter dem Aspekt einer möglichen inflammatorischen Reaktion nach subkutaner Implantation durchgeführte *in vivo* Tierversuchsstudien mit Ratten offenbarten eine erhöhte Adhärenz von Leukozyten und Makrophagen durch das Polymer. Dennoch fiel die Reaktion geringer aus als beispielsweise bei PDMS und Polyurethan. [146, 147] Merolli *et al.* zeigten hingegen, dass die Implantation von Carbon/Glasfaser verstärkten PEI-Zylindern in Muskel und Knochengewebe von Kaninchen im Vergleich zu Implantaten auf Kobalt-Chrom-Basis (Stellite) keine nachteilige inflammatorische Reaktion mit sich brachte und PEI über mehrere Wochen hinweg vergleichbar gut vom Organismus in beide Gewebetypen integriert wurde. [148] In den vergangenen zwei Dekaden bewegten sich die wissenschaftlichen Fragestellungen für PEI immer mehr in Richtung einer Verwendung als Beschichtung von unzureichend biokompatiblen Implantatmaterialien, Trägermaterial für den Hautersatz oder für das kardiovaskuläre Anwendungsfeld. [149, 150] Für diese Strategien wurden die Studien des Polyetherimids auf die Untersuchung der Zytotoxizität und Hämokompatibilität fokussiert. Es wurden verschiedene *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich einer zytotoxischen Reaktion von Mausfibroblasten mit unterschiedlich prozessierten PEI-Oberflächen durchgeführt. [151, 152] Im Ergebnis war die Zellmorphologie und -integrität *in vitro* im Vergleich zu plasmabehandeltem PS (TCP, engl.: *tissue culture plate*) unverändert, jedoch war die metabolische Aktivität sowie Proliferation verringert. Ebenso verhielt es sich mit der Hämokompatibilität in Hinsicht auf Koagulation und Aktivierung des Komplementsystems. [151] Für eine Verwendung von PEI als artifizielles kardiovaskuläres Implantatmaterial und eine damit verbundene Endothelialisierung konnten Tzoneva *et al.* zeigen, dass HUVEC fähig waren auf porösen PEI-Membranen zu adhären und zu proliferieren, wobei die Proliferationsrate im Vergleich zu PET erneut verringert war. [153] Die Untersuchung des gleichen Substrates hinsichtlich seiner Hämokompatibilität (Aktivierung des Koagulationssystems, Plättchenadhärenz und -aktivierung) ergab durchweg eine verbesserte Thrombogenität verglichen mit PET, welches zusammen mit PTFE seit Jahrzehnten als Goldstandard für Implantatmaterialien im kardiovaskulären Anwendungsfeld gilt. [79] An diese Studien anknüpfend konnten Braune *et al.* in einer vergleichenden Studie zwischen PEI Membranen und Filmen zeigen, dass die Thrombogenität eines Materials stark durch die Art der Prozessierung beeinflusst werden kann. Hierbei verbesserte sich die Hämokompatibilität von PEI-Filmen im Vergleich zu den Membranen durch eine Verringerung der Oberflächenrauigkeit deutlich. [42] Kürzlich wurde ebenso die Immunkompatibilität der PEI-Filme untersucht. Es konnte wie bei den Membranen keine nennenswerte Antwort früher Immunmechanismen wie die Aktivierung von Makrophagen oder des Komplementsystems sowie keine Generierung reaktiver Sauerstoffspezies aus Vollblut oder inflammatorischer Mediatoren aus Leukozyten nachgewiesen werden. [154]

Es wird an dieser Stelle deutlich, dass PEI in Form von Filmen nicht nur hinsichtlich seiner Rolle als Interaktionspartner für die Generierung optimierter DNS-basierter Liganden, sondern ebenso durch seine vergleichbar gute Hämo- und Biokompatibilität ein ideales Kandidatenmaterial für eine spätere Liganden unterstützte Endothelialisierung darstellte. Dennoch lagen bisher keine Daten bezüglich der zytotoxischen Bewertung als auch der Interaktion der speziellen Prozessierungsform des PEI als Film mit Endothelzellen vor. Dies waren ebenfalls Fragestellungen, welche im Rahmen des Promotionsprojektes beantwortet werden sollten.

### 1.7.3. Physikalische Interaktionen zwischen DNS-Aptameren und PEI

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die unterschiedlichen Wechselwirkungen vorgestellt, welche in Zusammenhang mit der Interaktion von Nukleinsäuren und Festkörperoberflächen stehen. Anschließend erfolgt eine genauere Einschätzung möglicher Wechselwirkungen zwischen Aptameren und der PEI-Oberfläche. Eine allgemein gültige Einteilung wirkender Kräfte gestaltet sich dennoch schwierig, da deren grundlegende Mechanismen sich zum Teil gegenseitig bedingen bzw. beeinflussen. Von daher wurde die Einteilung nach dem für diese Thematik am sinnvollsten erscheinenden Schema erstellt.

#### *"Schwache" Wechselwirkungen*

Zu den schwachen Wechselwirkungen zählen jene, die zumeist nur über relativ kurze Distanzen zwischen benachbarten Atomen oder Molekülen wirksam sind. Dabei sind elektrostatische Interaktionen zwischen zwei permanenten, einem permanenten und einem induzierten oder auch zwei induzierten Dipolen (van-der-Waals (vdW) Interaktionen) zu nennen. Die bei diesen Interaktionen frei werdende Energie bewegt sich in wässriger Umgebung im Bereich von 4 - 20 kJ/mol und ist damit deutlich geringer als bei kovalenten Einzelbindungen. (200 - 400 kJ/mol) Dieser Umstand bringt es auch mit sich, dass diese Formen physikalischer Interaktionen bei physiologischen Temperaturen (25 - 37 °C) vergleichsweise schwach und kurzlebig sind. In biologischen Systemen wirken daher oft multiple physikalische Interaktionen zusammen, um stabile und spezifische intra- bzw. intermolekulare Assoziationen zwischen Makromolekülen herzustellen. Dieses Prinzip der multivalenten Interaktion ist beispielsweise für die spezifische Konformation von Proteinen oder die selektive Ligandenbindung essentiell.

Interaktionen zwischen zwei Molekülen mit permanentem elektrischen Dipol (sog. Dipol-Dipol-WW) sind spezifische und gerichtete Interaktionen zwischen gegenteilig partial geladenen Molekülteilen. Ihre Stärke ist von der Entfernung und relativen Orientierung der Dipole zueinander abhängig und liegt in wässriger Umgebung im Bereich von ~2 kJ/mol. Der Dipol innerhalb eines Moleküls entsteht durch Unterschiede in der Elektronegativität aneinander gebundener Atome, wobei das elektronegativere Element die Bindungselektronen an sich heranzieht und somit ein statisches Dipolmoment hervorruft, welches die kovalente Bindung polarisiert. In der richtigen Orientierung und unmittelbaren Nähe zueinander können solche polarisierten Gruppen schwache elektrostatische Interaktionen miteinander eingehen. Einen Sonderfall dieser Form der Interaktion stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar, welche weiter unten gesondert betrachtet werden.



Bei vdW Interaktionen handelt es sich um eine induzierte Wechselwirkung zwischen nicht-kovalent verbundenen Atomen ohne permanenten Dipol. Anfänglich hervorgerufen wird dieses Phänomen durch zufällige Fluktuationen in der Elektronendichte des einen Atoms, welche sich auf ein anderes Atom übertragen und gegenseitig synchronisieren. Dadurch bauen diese Atome eine elektrostatische Anziehung auf, welche mit der zwischen gegenteilig ausgerichteten permanenten Dipolen vergleichbar ist. Jedoch ist diese Wechselwirkung nicht gerichtet und der frei werdende Energiebetrag mit  $\leq 1$  kJ/mol deutlich geringer. Die Stärke von vdW Interaktionen hängt in hohem Maße vom Abstand der jeweiligen Atome/Moleküle zueinander ab. Das heisst, sie sind maximal, wenn der Abstand äußerst gering ist. Kommen sich die Interaktionspartner allerdings zu nahe erfolgt eine Repulsion durch die negative Ladung ihrer jeweiligen äußeren Elektronenhüllen. Befinden sich zwei Atome in exakter Balance zwischen Anziehung und Repulsion spricht man von vdW-Kontakt zwischen ihnen. Der internukleare Abstand setzt sich hierbei aus der Summe beider vdW-Radien zusammen und entspricht i.d.R. etwa dem doppelten Abstand einer entsprechenden kovalenten Bindung. Von besonderer Bedeutung ist, dass sich vdW Interaktionen stets additiv, anziehend und proportional zur Kontaktfläche verhalten. Demnach ist für die Ausbildung multipler Interaktionen zwischen größeren Molekülen die Konformation ein entscheidender Faktor, da sich die Atome so weit wie möglich annähern müssen.

### ***Ionische Wechselwirkungen***

Ionische Wechselwirkungen stellen ebenso eine Form elektrostatischer Interaktion dar, mit dem Unterschied, dass sie ungleich stärker und weitreichender sind als bei den bereits beschriebenen "schwachen" Interaktionen. Anders als bei Dipol-Wechselwirkungen sind rein ionische Interaktionen nicht gerichtet. Vielmehr bildet sich um ein Ion ein gleichmäßig ausgeprägtes elektrostatisches Feld aus, welches eine Anziehung auf gegenteilige Ladungen ausübt. Ein gerichteter Charakter tritt lediglich bei der Beteiligung eines oder mehrerer Dipole an der Interaktion auf. (Ion-Dipol Interaktion) Die Stärke einer ionischen Interaktion ist mit 100 - 350 kJ/mol durchaus mit einer kovalenten Bindung vergleichbar. Da die Wechselwirkung jedoch stark von der Permittivität des umgebenden Mediums abhängt, liegt der Energiegewinn in wässriger Umgebung deutlich niedriger. In biologischen Fluiden sind in freier Form häufig einfache Kationen wie  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  als auch Anionen wie  $Cl^-$  anzutreffen. Diese bewegen sich nicht komplett frei in der Lösung, sondern sind stets hydratisiert. Die vergleichsweise große Menge an bei der Hydratisierung frei werdender Energie ist ein Grund für die gute Löslichkeit von Ionen in Wasser. Ebenso schirmt der Käfig aus Wassermolekülen gegenteilig geladene Ionen voneinander ab und verhindert ihre erneute Assoziation.

### ***Hydrophobe Wechselwirkungen***

Hydrophobe Moleküle bzw. Molekülteile die weder eine Ladung noch ein Dipolmoment aufweisen und demnach auch nicht hydratisiert werden können, lagern sich in wässrigen Lösungen zusammen. Die für diesen Mechanismus verantwortliche, treibende Kraft begründet sich aus der Energie, welche benötigt wird, um ein hydrophobes Molekül von Wassermolekülen zu umgeben. Da das Molekül keine direkten Interaktionen mit dem Wasser eingehen kann, zwingt es die umgebenden Wassermoleküle einen starren Käfig um das hydrophobe Molekül zu bilden. Als

Resultat wird eine bestimmte Anzahl von ihnen an den hydrophoben Kontaktflächen in eine entropisch ungünstige höhere strukturelle Organisation gezwungen. Durch eine Zusammenlagerung hydrophober Moleküle wird die Kontaktfläche verringert und mit ihr auch die Anzahl in der Bewegung eingeschränkter Wassermoleküle, was sich wiederum in einem Entropiegewinn äußert. Darüber hinaus können hydrophobe Moleküle in unmittelbarer Nähe zueinander ebenfalls sehr schwache vdW Interaktionen ausbilden, was ihre Zusammenlagerung zusätzlich unterstützt.

### ***Wasserstoffbrückenbindung***

Bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen handelt es sich im eigentlichen Sinn um eine elektrostatische Dipol-Dipol-Interaktion, welche ausschließlich bei der Bindung von Wasserstoff an eines der vier elektronegativsten Elemente (F, O, N, Cl) auftritt. Unter diesen Voraussetzungen ist das Wasserstoffatom fähig zusätzlich zur kovalenten Bindung an sein elektronegatives Donoratom eine weitere schwache Interaktion zu einem ebenfalls elektronegativen Akzeptoratom einzugehen. Hierbei muss das Akzeptoratom ebenfalls über mindestens ein freies Elektronenpaar auf seiner äußeren Schale verfügen, welches durch die partiell positive Ladung des Wasserstoffes angezogen wird. Die in biologischen Systemen entscheidenden Donor- und Akzeptoratom sind meist N oder O, wobei häufig vorkommende Amino- oder Hydroxylgruppen durch ihre polare Bindung in der Regel immer an H-Brücken beteiligt sind. Die Länge einer Wasserstoffbrücke liegt, abhängig vom Donor/Akzeptoratom, etwa im Bereich von 3 Å und ist damit in der gleichen Größenordnung wie vdW-Interaktionen. Da H-Brücken genau wie andere elektrostatische Dipol-Dipol-Interaktion gerichtet sind, ist ihre Stärke von der Orientierung zwischen Donor, Wasserstoff und Akzeptor abhängig. Am stärksten sind sie, wenn alle beteiligten Atome linear ausgerichtet sind. Die frei werdende Energie kann in wässriger Umgebung bis zu 5 kJ/mol betragen, was gewöhnliche Dipol-Dipol-Interaktionen deutlich übersteigt. Mit steigender Nonlinearität verringert sich auch die Stärke der Interaktion. Dennoch ist es nicht unüblich, dass mehrere nicht-lineare H-Brücken eine bestimmte Molekülkonformation stabilisieren, da sich die physikalischen Interaktionen stets nach dem Prinzip der Multivalenz aufsummieren.

### ***Wechselwirkungen zwischen delokalisierten $\pi$ -Systemen***

Interaktionen zwischen delokalisierten  $\pi$ -Systemen zweier Moleküle sind immer als eine Überlagerung verschiedener wechselwirkender Kräfte zu betrachten. Das durch Hunter und Sanders *et al.* postulierte elektrostatische Modell beschreibt aromatische Systeme sehr anschaulich als positiv geladene  $\sigma$ -Rahmen zwischen zwei negativ geladenen  $\pi$ -Elektronenwolken. [99] Interaktionen zwischen diesen Systemen beruhen jedoch nicht auf attraktiven Wechselwirkungen zwischen zwei  $\pi$ -Systemen sondern treten vielmehr dann auf, wenn die attraktiven Kräfte zwischen der  $\pi$ -Elektronenwolke des einen Systems und dem  $\sigma$ -Gerüst des anderen die repulsiven Kräfte zwischen den  $\pi$ -Elektronen zwischen beiden Systemen überwiegen. Die Energie der Interaktion setzt sich hierbei maßgeblich aus elektrostatischen, dispersen und repulsiven Komponenten zusammen. Die Geometrie der  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen wird durch die elektrostatische Komponente bestimmt, jedoch beruhen die energetischen Aspekte ebenso auf den anderen Faktoren. Dieses weithin anerkannte Modell schlussfolgert, dass je größer die Repulsion zwischen zwei  $\pi$ -Systemen

ist, desto positiver und damit unvorteilhafter ist die elektrostatische Interaktionsenergie. [99, 100] In dieser Betrachtung spielen Einflüsse gebundener Substituenten ebenso eine große Rolle. Substituenten können einen großen Einfluss auf die  $\pi$ -Elektronenwolken eines Aromaten haben und damit auch auf die Interaktion zwischen  $\pi$ -Systemen wechselwirkender Moleküle. [155] Dies betrifft nicht nur die Stärke der elektrostatischen Repulsion zwischen den  $\pi$ -Elektronenwolken, sondern ebenso direkte  $\pi$ -Atom-Wechselwirkungen zwischen Substituenten des einen Rings mit der  $\pi$ -Elektronenwolke des anderen. Elektronenschiebende Substituenten an einem der interagierenden Moleküle bewirken eine Erhöhung der negativen Ladungsdichte in der  $\pi$ -Elektronenwolke und somit eine gesteigerte Repulsion zwischen zwei interagierenden aromatischen Systemen. Elektronenziehende Substituenten haben einen gegenteiligen Effekt. [99]

Hinsichtlich einer bevorzugten Konfiguration von  $\pi$ -Systemen zueinander zeigte sich durch vergleichende Versuche zwischen Benzolen und substituierten Varianten, dass eine Sandwichkonfiguration (face-to-face) meist bevorzugt ist. Jedoch ist diese in der Regel verschoben, da bei vollständiger Überlappung die Repulsion zwischen den  $\pi$ -Elektronenwolken maximal und damit energetisch ungünstig ist. [155] Eine parallel verschobene Konfiguration wird unabhängig vom Substituierungsgrad bevorzugt, weil die Repulsion bei der Verschiebung stärker abnimmt, als sich die Interaktion durch andere Faktoren wie Dispersion und Elektrostatik verringert. Unter der Einwirkung verschiedener Substituenten zeigte sich, dass substituierte Benzole in verschobener Sandwichkonfiguration konsequent besser miteinander interagieren. Hierbei waren elektrostatische Interaktionen erneut durch elektronenziehende Substituenten begünstigt. Gründe dafür waren eine leicht positivere Ladung des Rings und eine damit verbundene Erhöhung der Attraktivität von  $\pi$ - $\sigma$ -Interaktionen. Außerdem bewirkte die reduzierte Ladungsdichte der  $\pi$ -Elektronenwolke eine verringerte Repulsion.

Die Einführung polarisierender Heteroatome, wie es bei den Nukleotidbasen durch Stickstoff der Fall ist, führen innerhalb des Ringsystems zu Veränderungen der molekularen Ladungsverteilung. Im Zusammenspiel mit gebundenen Substituenten bewirkt dies zum Teil deutlich ausgeprägte Bereiche mit nukleo- sowie elektrophilem Charakter. In solchen Systemen dominieren Interaktionen zwischen partiell gegenteilig geladenen Atomen, als auch Atom- $\pi$  Interaktionen zwischen einem partiell positiv geladenen Atom und der  $\pi$ -Elektronenwolke eines anderen aromatischen Systems. In Hinsicht auf Nukleotidbasen sind bei den Purinen Bereiche mit negativem Ladungspotenzial deutlich stärker ausgeprägt als bei den Pyrimidinen, welche bei der molekularen Ladungsverteilung eher einen Dipol aufweisen. [100, 156]

Metallionen im umgebenden Medium haben keinen Einfluss auf die Geometrie der  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion. Allerdings können sie ihre Stärke beeinflussen. Durch Lokalisierung einer starken positiven Ladung in unmittelbarer Nähe zu einem  $\pi$ -System kann eine schwache elektrostatische Anziehung entstehen, welche wiederum zu vorteilhaften Interaktionen mit  $\pi$ -Elektronen eines anderen aromatischen Systems führt. Hierbei gilt, je größer die positive Ladung des Metallions, desto stärker ist die Interaktion mit den  $\pi$ -Systemen. [99]

Das Zusammenspiel zwischen  $\pi$ -Interaktionen und der Ausbildung von H-Brücken ist bisher nur in Ansätzen untersucht. Erste Studien und quantenmechanische Berechnungen von relativ wenig komplexen Systemen mit Pyrimidin und verschiedenen substituierten Benzolen unter idealisierten

lösungsmittelfreien Bedingungen weisen darauf hin, dass paralleles Stacking die Fähigkeit als H-Brückenakzeptor zu fungieren erhöht und dieser Effekt für elektronenschiebende Benzol-substituenten größer war. [157] Das heisst, umso repulsiver die elektrostatische Interaktion zwischen den  $\pi$ -Systemen war, desto größer war die Fähigkeit H-Brücken zu bilden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Betrachtung gestapelter Basen in DNS und der Untersuchung von Cytosin in Wechselwirkung mit substituierten Benzolen, wobei im letzten Fall lediglich die Bindungsfähigkeit des exozyklischen Sauerstoffes erhöht war. [100] Als Begründung wurde die erhöhte repulsive Interaktion postuliert, wobei die Elektronendichte und damit negative Ladung durch Ladungstransfer am Akzeptoratom erhöht und so die Fähigkeit das Proton in einer H-Brücke an sich zu binden verstärkt wurde.

### ***Konzept der multivalenten Interaktion***

Das Konzept der multivalenten Interaktion basiert auf der simultanen Interaktion multipler bindender Valenzen eines Moleküls (oder einer Grenzfläche) mit korrespondierenden bindenden Gruppen eines anderen Moleküls durch die Kombination schwacher intermolekularer nicht-kovalenter WW. [158, 159] In vielen biologischen Systemen dienen solche multivalenten WW dazu, im Rahmen von Erkennungs- oder Signalprozessen, ausgeprägte und reversible Bindungen zwischen zwei Molekülen zu ermöglichen, deren additive Bindungsstärken kovalenten Bindungen mitunter sehr nahe kommen. [160] Hierbei ist es nicht selten der Fall, dass die Bindung eines Liganden die Bindungsaffinität eines weiteren Rezeptors für einen weiteren Liganden an derselben Entität erhöht. (sog. Cluster Effekt) [161] Die WW zwischen den betreffenden Molekülen sind in diesem Fall synergistisch und stärker als die Summe der Bindung korrespondierender monovalenter Liganden. Welche Mechanismen dieser positiven Kooperativität zu Grunde liegen wird momentan intensiv diskutiert. Eine erhöhte Rezeptoraffinität für die Bindung eines weiteren Liganden wird hierbei einer Erhöhung der lokalen Ligandenkonzentration sowie einer erleichterten solvatisierungsbedingten Zunahme der Entropie durch die direkte Verknüpfung von Liganden zugeschrieben, womit die Interaktion quasi intramolekular stattfinden würde. [159] Multiple Interaktionen zwischen zwei Molekülen sind jedoch nicht automatisch mit Kooperativität gleichzusetzen. Ebenso können sich die Interaktionsenergien von nicht-kovalenten Mehrfachbindungen unkooperativ addieren oder auch einen interferierenden Effekt besitzen, so dass die Affinitäten weiterer Rezeptoren mit jeder Ligandenbindung abnehmen. Die exakte Beschreibung multivalenter Bindungsvorgänge gestaltet sich bei biologischen Systemen im Allgemeinen schwierig, da diese meist nicht ausreichend definiert sind und die Anzahl interagierender Valenzen unbekannt ist. [158] Dennoch bildet diese Form der Interaktion die Grundlage der hochaffinen und selektiven Bindung von Aptameren an ihre Zielstruktur.

Beim Screening nach bindenden DNS-Aptameren gegen die Oberfläche von PEI-Filmen würden die Nukleinsäurebasen nach dem o.g. Konzept als gekoppelte Liganden für die Interaktion mit der polymeren Grenzfläche wirken. Durch die repetitiven Selektionsschritte sollten sich mit voranschreitender Selektion in ihrer Basensequenz optimiert multivalent interagierende Aptamere anreichern, welche deutlich ausgeprägtere WW mit der Polymeroberfläche eingehen können als es die unselektierten Sequenzen der Ausgangsbibliothek vermögen.

### ***Mechanismus der Aptamer-PEI Interaktion***

Zur Beschreibung der physikalischen Bindung eines Oligonukleotids an die PEI Oberfläche wird zunächst der initiale Zustand der beteiligten Bindungspartner vor der eigentlichen Interaktion betrachtet. Unter wässrigen Bedingungen sind zunächst entropisch getriebene Solvatisierungseffekte sowie Wechselwirkungen zwischen den Oligonukleotiden vorherrschend. Der hydrophobe Charakter der Nukleotidbasen lässt hierbei alle noch stabilen Variationen zu, solange der Kontakt zum umgebenden polaren Lösungsmittel vermieden werden kann. Dieser entropisch getriebene Prozess bringt die gefalteten Aptamere dazu, eine minimal hydrophobe Form einzunehmen. Das heisst, die hydrophoben Basen werden nach Möglichkeit vor dem polaren Lösungsmittel abgeschirmt und das polare Phosphatrückgrat hin zur wässrigen Phase ausgerichtet. [156] Da es sich bei den Aptameren nicht um thermodynamisch starre Strukturen handelt, ist ebenso anzunehmen, dass sie sich Entropie getrieben teils zu lockeren unorganisierten Aggregaten zusammenlagern. Im Puffer enthaltene mono- und divalente Metallionen wirken bei diesem Vorgang unterstützend, da sie mit dem anionischen DNS-Rückgrat assoziieren und so die Coulomb Repulsion durch die negativen Ladungen kompensieren. Dies gilt sowohl für eine Annäherung untereinander, als auch für die an eine Festkörperoberfläche. In biologischen Systemen machen sich beispielsweise DNS bindende Proteine die multiplen negativen Ladungen zu Nutze, um wiederum mit ihren vielen (partial) positiven Ladungen über das Rückgrat den Kontakt zur DNS herzustellen. Für eine selektionsgetriebene und damit von der Basensequenz der Aptamere abhängige optimierte Bindung an PEI war, wie bereits angesprochen, eine ausgeprägte Interaktion des DNS-Rückgrats mit der PEI-Oberfläche zu vermeiden. Dennoch waren im Puffersystem der *in vitro* Selektion Metallionen wie  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Mg^{2+}$  nötig, da sie entscheidend zur Stabilisierung von Aptamerkonformationen beitragen und darüber hinaus langreichweitige elektrostatische Interaktionen zur initialen Rekrutierung der Aptamere an die PEI-Oberfläche fördern.

Für die PEI Oberfläche ist anfangs aufgrund der multiplen partial negativ geladenen Carbonylgruppen makroskopisch ein leicht negatives Oberflächenpotenzial anzunehmen, so dass im Puffer enthaltene Kationen über Ion-Dipol-Interaktionen mit der PEI-Oberfläche in Kontakt stehen. [99] Dennoch ist der aromatische Charakter vorherrschend, wodurch die Polymeroberfläche nur gering hydratisiert vorliegt und der Kontakt mit den vergleichsweise hydrophoben Nukleotidbasen entropisch begünstigt ist.

Es ist anzunehmen, dass bei der Interaktion von einzelsträngiger DNS mit einer festen Oberfläche vergleichbare Mechanismen ablaufen, wie es bei der Proteinadsorption der Fall ist. [23, 96, 162] Der erste Schritt bei der Interaktion von Aptameren mit der PEI-Oberfläche wäre das "Einfangen" der in Lösung befindlichen DNS über elektrostatische Kräfte, welche eine höhere Reichweite besitzen. Hierbei würden an der Materialoberfläche bzw. am DNS-Rückgrat assoziierte Metallionen eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Vorgang wäre ebenso energetisch begünstigt, da er durch Assoziation hydrophober Komponenten mit einer Erhöhung der Entropie verbunden wäre. Umso näher die Aptamere der Polymeroberfläche kommen, desto größer wird der Einfluss attraktiver "schwacher" Wechselwirkungen zwischen der chemischen Struktur des PEIs und den verschiedenen Nukleotidbasen der DNS. Dieser Vorgang kann mit einer Konformationsänderung der Aptamere verbunden sein, da die zuvor vor dem polaren Lösungsmittel abgeschirmten hydro-

phoben Basen nun mit der ebenfalls hydrophoben PEI-Oberfläche in engen Kontakt treten und weitere physikalische Interaktionen eingehen können. Im direkten Kontakt mit der PEI-Oberfläche kommt es über "schwache" Wechselwirkungen zu spezifischeren Interaktionen einzelner Basen bzw. chemischer Komponenten mit ebensolchen des PEI. Hierbei können alle beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Nukleotidbasen und PEI additiv zur Stabilisierung eines Aptamers beitragen, wobei elektrostatische Dipol-Dipol- (z.B. H-Brücken) und Interaktionen zwischen delokalisierten  $\pi$ -Systemen ( $\pi$ - $\pi$ -,  $\pi$ - $\sigma$  und  $\pi$ -Atom-Wechselwirkungen) am wahrscheinlichsten sind.

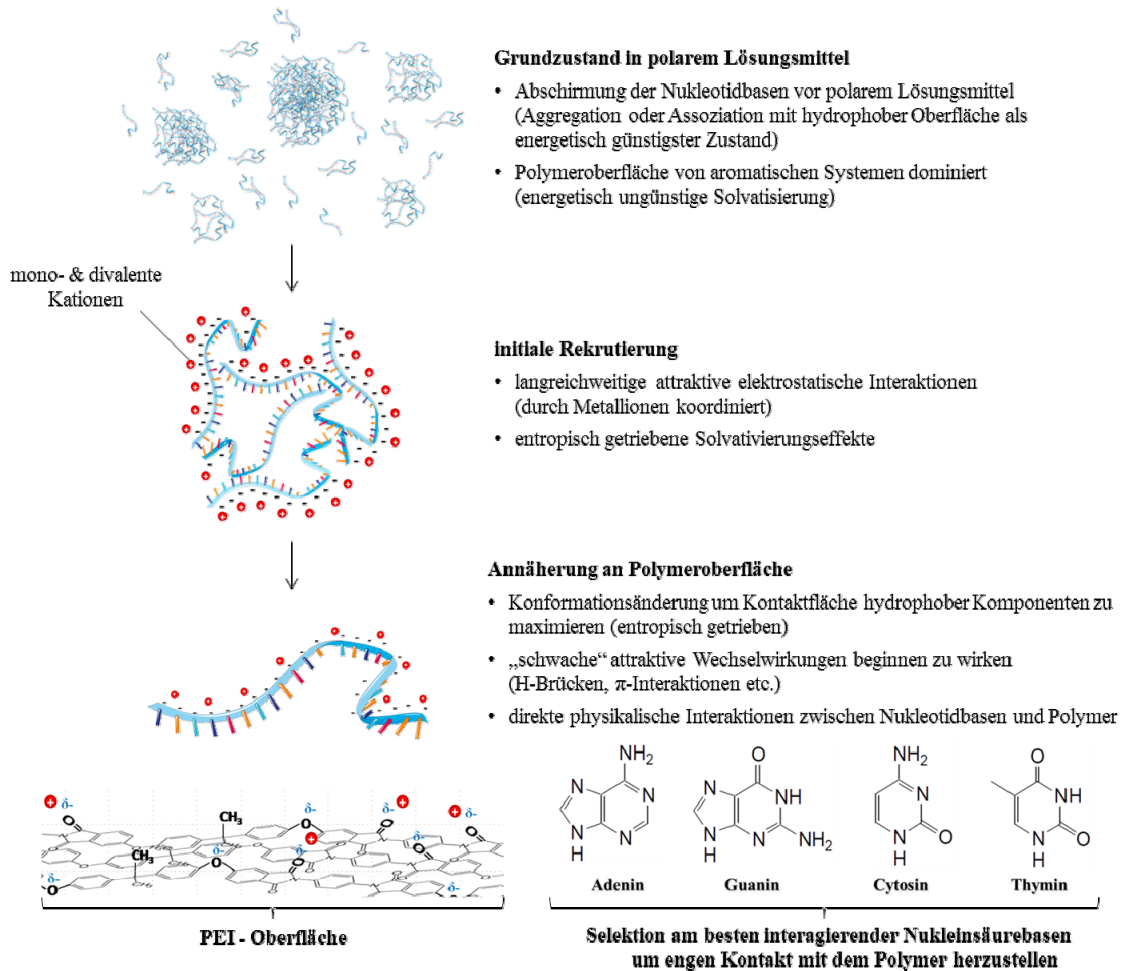


Abbildung 6. Schematische Übersicht des Mechanismus der Aptamer-PEI Interaktion

Begründet wird dies anhand der chemischen Strukturen der Interaktionspartner. PEI verfügt über eine Vielzahl partiell negativ geladener Sauerstoffatome der Carbonylgruppen, welche ebenso wie die Sauerstoffe der Etherbrücken über ihre freien Elektronenpaare als mögliche H-Brückenakzeptoren wirken können. Gleichzeitig ziehen die Carbonylgruppen über einen (-M)-Effekt Elektronendichte aus dem aromatischen System ab, was zu einer Verringerung der elektrostatischen Repulsion sowie einer leicht positiveren Ladung des  $\sigma$ -Rings führt und damit möglichen Interaktionen zwischen  $\pi$ -Systemen zuträglich ist. [99, 155] Die Nukleotidbasen weisen auf der anderen Seite eine Vielzahl funktioneller Gruppen auf, welche als H-Brückendonoren als auch

Akzeptoren dienen können. Allem voran sind hier primäre und sekundäre Aminogruppen von Bedeutung. Diese könnten über Dipol-Dipol-WW in direkten Kontakt mit der PEI-Oberfläche treten. Guanin wäre hierbei als einzige Nukleotidbase in der Lage, zwei Wasserstoffe für die Ausbildung von H-Brücken zur Verfügung zu stellen. Hinsichtlich möglicher  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen würden abgesehen von Thymin alle Basen durch ihre substituierte primäre Aminogruppe ((+M)-Effekt) eine verstärkte Repulsion aufweisen, was sich nach den oben genannten Erkenntnissen positiv auf die Ausbildung von H-Brücken, jedoch nachteilig auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen auswirken würde. Besonders davon betroffen sind Purine, da die höhere Anzahl von Heteroatomen die negative Ladungsdichte zusätzlich erhöht.

Eine exakte Voraussage, welche Sequenzabfolge von Nukleotidbasen am besten mit der PEI-Oberfläche interagieren kann, ist an dieser Stelle nicht möglich und unterstreicht die Notwendigkeit eines Screenings nach optimiert bindenden DNS-Liganden. Hierbei sollten bestimmte Nukleotidbasen oder Kombinationen von ihnen stärker ausgeprägte Interaktionen mit der Polymeroberfläche eingehen können als andere und sich somit im Laufe der *in vitro* Selektion Liganden mit optimierter Basenabfolge (Bindungsmotiv) für eine maximal multivalente Wechselwirkung herauskristallisieren.

### 2. MOTIVATION UND ZIELE DER DISSERTATION

Synthetische Gefäß-Bypässe sind in der klinischen Praxis oftmals mit einem im Vergleich zu autologen Gefäßen erhöhten Risiko für Komplikationen verbunden. Als eine der Hauptursachen für das Versagen der Implantate wird eine unzureichende Hämokompatibilität der artifiziellen Oberfläche diskutiert. Von den zahlreichen Konzepten zur Verringerung der Thrombogenität stellt die Generierung einer natürlichen anti-thrombogenen Schicht durch Besiedlung mit autologen Endothelzellen die vielversprechendste Strategie dar. Die Generierung einer funktionell konfluenten und scherresistenten Endothelzellschicht gestaltet sich jedoch auf den meisten synthetischen Oberflächen schwierig, da diese aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften keine ausreichend stabile Endothelialisierung erlauben.

Strategien für eine Verbesserung der Endothelialisierung artifizieller Biomaterialoberflächen beruhen in der Vergangenheit auf der Immobilisierung komplexer zellbindender Liganden in Form von makromolekularen EZM-Komponenten. [55] Modernere Endothelialisierungsstrategien gehen heute mehr in Richtung einer zellselektiven Rekrutierung durch die Verwendung niedrigmolekularer, optimierter Liganden, welche entweder in Form von Peptiden zellbindende Motive aus Makromolekülen der EZM nachahmen [62, 63], als monoklonale Antikörper gegen Oberflächenmarker der Zellen gerichtet sind [66-68] oder nach dem Prinzip der optimierten Multivalenz durch Screeningverfahren der *in vitro* Selektion speziell für die Zellerkennung und Bindung generiert wurden. [70-72] Besonders durch Screeningstrategien generierte Liganden wie Peptide und Aptamere besitzen durch ihre hohe Selektivität und Affinität großes Potenzial, eine effektive Endothelialisierung zu erreichen. Für die effektive Funktionalisierung einer Oberfläche kommt für diese niedermolekularen Liganden in der Regel nur eine kovalente Immobilisierung in Frage, da ihnen anders als bei Makromolekülen eine hohe Anzahl an Valenzen für eine stabile physikalische Interaktion mit der Matrix fehlen. Verfahren der kovalenten Immobilisierung können sich jedoch negativ auf die spätere Anwendung in biologischen Systemen auswirken. Es besteht die Gefahr einer Alterierung vorteilhafter physikalisch-chemischer Eigenschaften der Oberflächenchemie des Materials oder einer deutlich verringerten bzw. veränderten biologischen Aktivität der Liganden. [49, 50, 56, 57] Dies kann zu unvorhersehbaren Reaktionen des biologischen Systems führen, im schlimmsten Fall zu einem Versagen des Implantates. Ebenso müssen als Voraussetzung für eine kovalente Anbindung stets geeignete Funktionalitäten zugegen oder induzierbar sein, was sich bei einigen Materialien schwierig gestaltet, ohne vorhandene positive Grenzflächeneigenschaften nachhaltig zu verändern.

Eine Alternative zur kovalenten Immobilisierung ist die Verwendung ebenso optimierter, an das Substrat bindender Liganden. Solche für die Bindung an die Materialoberfläche optimierten Moleküle nutzen verschiedene Formen nicht-kovalenter physikalischer Interaktionen mit dem Substrat, um nach dem Prinzip der Multivalenz eine stabile Oberflächenfunktionalisierung zu erreichen. Da sich die Vorhersage der chemischen und strukturellen Eigenschaften solch optimierter Liganden schwierig gestaltet, ist das Screening von Molekülbibliotheken mit hoher Diversität ein adäquates Mittel für deren Generierung. [93, 94] Hierfür bieten sich Verfahren der *in vitro* Selektion an, wobei auf Nukleinsäuren basierende Aptamere durch die höhere Diversität innerhalb kombinatorischer Bibliotheken und des geringeren Risikos immunologischer bzw. interferierender Reaktionen klare Vorteile gegenüber Peptiden besitzen. [95] Mit Hilfe der



## II. MOTIVATION UND ZIELE DER DISSERTATION

---

Aptamertechnologie, welche bereits für die selektive Erkennung und Bindung verschiedenster Zielstrukturen eingesetzt wurde, steht eine Methode zur Verfügung optimierte DNS-Liganden gegen polymere Oberflächen zu generieren und auf deren Basis eine rein auf physikalischen Interaktionen beruhende Strategie zur Verbesserung der Endothelialisierung zu entwickeln.

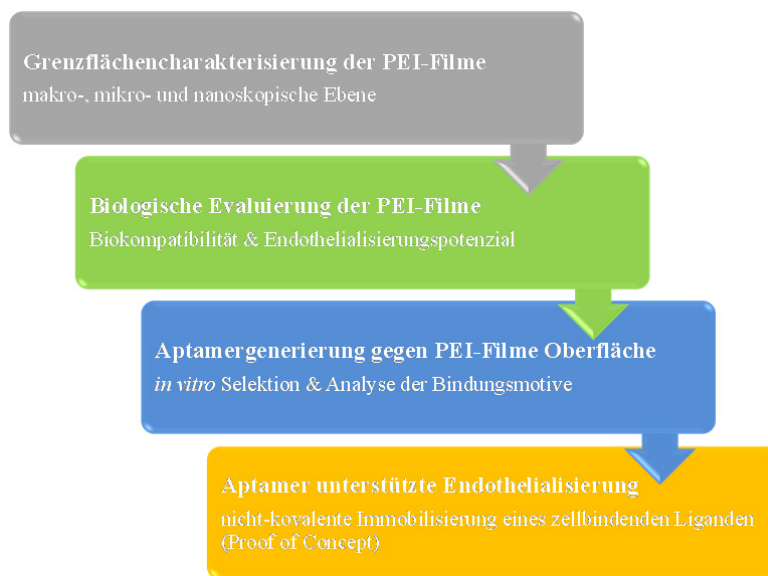
Die hier vorgestellte Dissertation wurde von der Frage motiviert, ob die Adaptierung einer auf Nukleinsäuren basierenden *in vitro* Selektionsstrategie (SELEX) für die Generierung multivalent bindender DNS-Aptamere gegen Polymer basierte Biomaterialoberflächen, im Speziellen gegen PEI-Filme als Modellpolymer, möglich ist. Weitergehend sollte ergründet werden, welche physikalischen Interaktionen zwischen Nukleinsäurebasen und Polymeroberfläche maßgeblich bei der Selektion von Bindungsmotiven entscheidend sind und ob durch die Aptamer vermittelte nicht-kovalente Immobilisierung eines niedrigmolekularen, zellbindenden Liganden eine Verbesserung der Endothelialisierung von Polymeroberflächen hinsichtlich der initialen Adhärenz und Scherresistenz erreicht werden kann.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden folgende Ziele formuliert:

- I. Design und Etablierung eines für polymere Festkörperoberflächen geeigneten *in vitro* Selektionsverfahrens und Screening nach PEI bindenden DNS-Aptameren im Rahmen der SELEX.
- II. Charakterisierung der Aptamerbindung auf PEI hinsichtlich Verteilung, Dichte und Stabilität sowie weitergehende Analyse isolierter Bindungsmotive in Korrelation mit den Grenzflächeneigenschaften des PEI, zur Aufklärung wirkender physikalischer Interaktionen und des Bindungsmechanismus.
- III. Anwendung der PEI bindenden Aptamere *in vitro* für die nicht-kovalente Immobilisierung eines zellbindenden Liganden zur Verbesserung der initialen Zelladhärenz und Scherresistenz von humanen Endothelzellen.

#### 3. STRATEGIE UND KONZEPT

Die vorgestellte Dissertation beinhaltet die Etablierung eines auf Nukleinsäuren basierenden *in vitro* Selektionsverfahrens auf Basis der SELEX-Methode zur Generierung von DNS-Aptameren, welche über multivalente physikalische Interaktionen an Polymeroberflächen binden. Dabei erfolgt die Charakterisierung der Wechselwirkungen selektierter Aptamer motive als auch der Interaktion von Endothelzellen mit der polymeren Matrix ausgehend von der makro- über die mikro- bis hin zur nanoskaligen bzw. molekularen Ebene, unter Betrachtung der in den jeweiligen Größenordnungen wirkenden physikalischen Kräfte. Dies wird anschließend in einem Machbarkeitsnachweis, in dem die *in vitro* Anwendung dieser Aptamere für die nicht-kovalente Immobilisierung eines zellbindenden Liganden zwecks Verbesserung der initialen Endothelzelladhärenz und -scherresistenz geprüft.



**Abbildung 7.** Strategische Vorgehensweise bei der Umsetzung des Dissertationsvorhabens.

Da die physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien einen direkten Einfluss auf Interaktionen mit anderen Molekülen bzw. Zellen und damit auf die Biokompatibilität haben, sollte in einem ersten Schritt die Grenzfläche des Modellpolymers eingehend untersucht werden, um auf diese Weise grundlegende Informationen über dessen Oberflächeneigenschaften zu erlangen. Das polymere Biomaterial sollte, in Anlehnung an die prominentesten nicht-kovalenten Interaktionsmöglichkeiten von Nukleinsäurebasen, multivalente physikalische Interaktionen zulassen, jedoch ebenso starke attraktive bzw. repulsive Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der Oligonukleotide vermeiden. Von daher sollte das Polymer aufgrund seiner Oberflächenkomposition fähig sein Dipol-Dipol Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen als auch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen eingehen zu können, jedoch unter physiologischen Bedingungen keine positiven (Partial)Ladungen oder negative Ladungen aufweisen. Die Topographie sollte in einer zu gefalteten Aptameren vergleichbaren Größenordnung von wenigen Nanometern liegen, um ausgeprägte multivalente Interaktionen zu ermöglichen, wobei eine hydrophobe Oberfläche diese Wechselwirkungen zusätzlich begünstigen und die Selektion bindender Liganden forcieren würde. Die Ermittlung der Grenzflächeneigenschaften des

Modelpolymers sollte sowohl auf Ebene einer möglichen Interaktion mit DNS-Aptameren im Nanometer bzw. molekularen Bereich als auch auf Ebene einer Interaktion zwischen Polymeroberfläche und Endothelzellen in der mikro- und makroskopischen Ebene erfolgen. Diese Erkenntnisse sind von fundamentaler Bedeutung für die finale Beurteilung der PEI-Filme als Kandidatenmaterial und somit essentieller Bestandteil für die Realisierung des ersten formulierten Zieles der Dissertation. Ebenso sollte dieses Wissen mit den späteren Resultaten der biologischen Validierung sowie der als zweiten Meilenstein formulierten Analyse bindender Aptamer motive korreliert werden. Für die Oberflächencharakterisierung der PEI-Filme sollten nach Möglichkeit analytische Methoden gewählt werden, welche eine Untersuchung in wässriger Umgebung erlauben, da die Interaktion mit Zellen und DNS in diesem Milieu stattfindet.

Nach der Charakterisierung des Polymersystems an seiner Grenzfläche sollte in Vorbereitung auf die *in vitro* Machbarkeitsstudie (Meilenstein 3) ebenso eine biologische Evaluierung des Substrates durchgeführt werden. Diese würde eine zytotoxische Bewertung und eine Einschätzung des Endothelialisierungspotenzials für das verwendete Modellpolymer beinhalten. Da eine unzureichende Zelladhärenz und Scherresistenz häufig in Kombination mit der Thrombogenität einer Oberfläche Auslöser für das spätere Versagen eines Implantates sind, sollte die Untersuchung den gesamten Zeitraum der Endothelialisierung beginnend mit der initialen Adhärenz bis hin zu einem funktionell geschlossenen Endothelzelllayer einschließen und in einem statischen als auch dynamischen *in vitro* Endothelialisierungsmodell durchgeführt werden. Die Zellen sollten eingehend hinsichtlich ihres proliferativen, funktionellen und inflammatorischen Aktivierungszustandes als auch ihrer Interaktion mit dem unterliegenden Substrat untersucht werden.

Für die im ersten Ziel der Dissertation beschriebene Generierung optimierter, über multivalente physikalische Interaktionen, an PEI bindender Aptamerliganden sollte initial eine geeignete kombinatorische DNS-Bibliothek mit äquimolarer Basenverteilung nach Kriterien einer ausreichenden Selektivität und Quantität bei der Amplifikation generiert werden. Da die Effizienz der Anreicherung bindender Aptamere aus der DNS-Bibliothek während der SELEX stark von der Stringenz der Bindungsbedingungen innerhalb der Selektionsrunden abhängt, sollte diese zur Forcierung der Selektion bindender Aptamersequenzen im Verlauf der *in vitro* Selektion stetig gesteigert werden. Dies beinhaltet die Verschiebung des Verhältnisses zwischen DNS und der angebotenen Polymerfläche (Zielstruktur), die Verkürzung der Inkubationszeit sowie die Ausdehnung von Waschschrinen. Ebenso wird nach den initialen Selektionsrunden ein Präselektionsschritt vor dem eigentlichen Selektionsschritt eingeführt, um der Anreicherung von unselektiv an verwendete Materialien der Laborgefäße oder Polymeren mit ähnlichen Oberflächeneigenschaften, jedoch anderer chemischer Zusammensetzung, entgegenzuwirken. Die Anpassung der beschriebenen Selektionsbedingungen sollte hierbei mit der quantitativen Überwachung des Selektionsfortschrittes verknüpft und bereits während der *in vitro* Selektion durchgeführt werden. Der iterative Prozess aus Selektion und Amplifikation wird bei der SELEX so lange durchgeführt, bis eine deutlich gesteigerte Bindung im Vergleich zur Startbibliothek erkennbar ist und eine Sättigung der Polymeroberfläche mit bindenden Liganden angenommen werden kann. Im Anschluss an die *in vitro* Selektion sollte, zum Erreichen des zweiten Ziels, die Oberflächenfunktionalisierung mit bindenden DNS-Aptameren hinsichtlich Verteilung, Dichte

und Stabilität in Abhängigkeit verschiedener Selektions- und Zellkulturbedingungen untersucht werden, um den Einfluss von Metallionen und proteinogenen Bestandteilen in der umgebenden wässrigen Phase auf Interaktionen zwischen Polymer und DNS zu ermitteln. Eine eventuell auftretende Veränderung der polymeren Grenzflächeneigenschaften durch die Aptamerbindung muss überprüft werden. Für die Ermittlung der Basensequenz angereicherter Aptamermotive sollte die angereicherte DNS-Bibliothek sequenziert und ermittelte Bindungsmotive auf molekularer Ebene miteinander, als auch mit den Daten der Grenzflächencharakterisierung korreliert werden. Diese Analysen liefern Informationen in Hinsicht auf die wirkenden physikalischen Wechselwirkungen zwischen Nukleotidbasen und Funktionalitäten der PEI-Oberfläche.

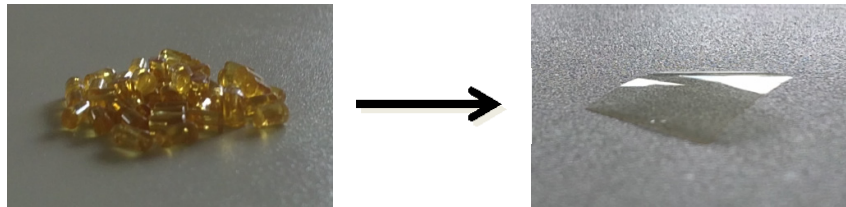
Im abschließenden Schritt sollte, zum Erreichen des dritten Meilensteines, die Aptamer basierte Oberflächenfunktionalisierung in einer *in vitro* Machbarkeitsstudie für die nicht-kovalente Immobilisierung eines endothelzellbindenden Liganden verwendet werden, um die Nutzbarkeit der Aptamertechnologie für polymere Biomaterialoberflächen zu überprüfen. Der zell- und der materialbindende Ligand sollten hierbei über nicht-kovalente Interaktionen miteinander gekoppelt werden können, um eine aufeinander aufbauende Immobilisierung der einzelnen Komponenten zu ermöglichen. Durch diese Vorgehensweise würde eine Interferenz der Bestandteile vor dem eigentlichen Materialkontakt vermieden und es gäbe eine größere Kontrolle über ihre Orientierung an der Polymeroberfläche. Die selektive Bindung der einzelnen Komponenten sollte mit geeigneten analytischen Methoden validiert sowie eine unspezifische Adsorption an die PEI-Oberfläche überprüft werden. Die Untersuchung einer Verbesserung der initialen Adhärenz und Scherresistenz der Endothelzellen auf Aptamer modifizierten PEI-Filmen im Vergleich zur unbeschichteten Matrix sollte im Vordergrund stehen und die Oberflächenfunktionalisierung im statischen und dynamischen Endothelialisierungsmodell untersucht werden.

## 4. METHODEN

Jegliche ergänzenden Herstellerangaben zu den in diesem Abschnitt aufgeführten Methoden sind aufgrund einer besseren Übersichtlichkeit gesondert im Materialenteil aufgeführt. (vgl. Kapitel 5)

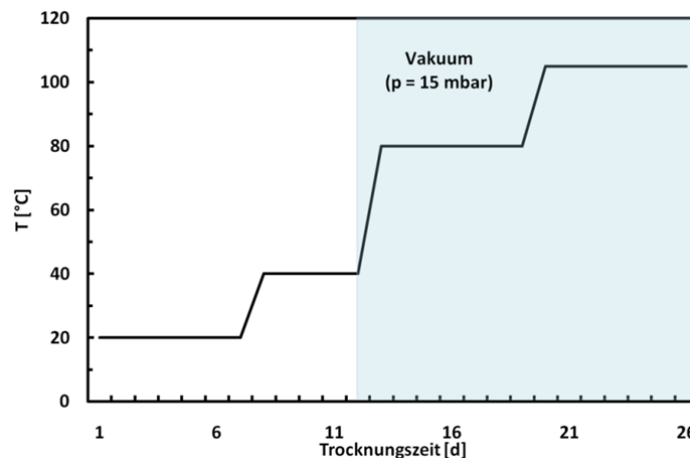
### 4.1. Herstellung und Prozessierung von PEI-Filmen

Für die Herstellung der PEI-Filme wurden Pellets des ULTEM<sup>®</sup> 1000 für 24 h in Dichlormethan (DCM) gelöst. Hierfür wurden 20 wt-% des Polymers in DCM in einem verschlossenen 500 ml Erlenmeyerkolben mit dem Magnetrührer bei Raumtemperatur (RT) in Lösung gebracht. Anschließend wurde die PEI/DCM-Lösung auf eine zuvor mit Chloroform gereinigte Glasplatte gegeben und mit einer Rakel auf eine Stärke von 300 µm glatt gezogen. [42] Nach einer kurzen Trocknungszeit (ca. 5 s) wurden die PEI-Filme mit einer Rasierklinge von den Glasplatten gelöst und zur initialen Trocknung für sieben Tage bei RT unter dem Abzug gelagert.



**Abbildung 8.** Prozessierung der Polyetherimid Filme aus Pellets des PEI ULTEM<sup>®</sup> 1000

Im Anschluss an den ersten Trocknungsschritt wurden die PEI-Filme zur weiteren Evaporation des Lösungsmittels in Autoklavierboxen überführt und die Trocknung nach dem etablierten Protokoll über einen Zeitraum von 25 Tagen bei steigender Temperatur (bis 105 °C) und gleichzeitiger Verringerung des umgebenden atmosphärischen Druckes (bis 15 mbar) durchgeführt. (Abbildung 9) [42] Vor der Verwendung der getrockneten PEI-Filme in Experimenten jeglicher Art wurde das Material für 20 min bei 121°C und 200 kPa in einem FVA A1 Autoklaven dampfsterilisiert und anschließend steril, trocken und dunkel bei RT gelagert.



**Abbildung 9.** Schematische Darstellung des Trocknungsprozesses der PEI-Filme zwecks Evaporation des Lösungsmittels DCM aus dem polymeren Material.

### 4.2. Gaschromatographie

Die Methode der Gaschromatographie (GC) wurde für den quantitativen Nachweis von potenziell aus dem PEI-Film evaporierendem Lösungsmittel angewendet. Hierbei wurde die GC mit der sogenannten Dampfraumanalyse (Headspace)-Technik durchgeführt, bei der sich flüchtige Bestandteile im Gasraum über der Probe sammeln und von dort aus entnommen und analysiert werden können. Für die quantitative Analyse des nach der Trocknung und Dampfsterilisation im Polymerfilm verbliebenen Lösungsmittels wurde 1 g des PEI-Films (~150 cm<sup>2</sup>) zusammen mit 9 ml Millipore Wasser in einer 15 ml Headspace-Probenflasche versiegelt und diese unter leichtem Schwenken bei 37 °C für 96 h inkubiert. Anschließend wurde die überstehende Atmosphäre mittels einer HP 5890 Series II GC analysiert.

### 4.3. Grenzflächencharakterisierung der PEI-Filme

Die Bestimmung der physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften des Modellpolymers PEI, als auch der in der Gegenselektion eingesetzten Materialien erfolgte unter Berücksichtigung der betrachteten Interaktionen auf unterschiedlichen Ebenen. Zum einen für den atomaren bzw. Nanometer Bereich mittels Rasterkraftmikroskopie, Röntgenphotoelektronen- und Raman Spektroskopie um die Grenzflächeneigenschaften auf Ebene einer Interaktion mit DNS Molekülen beurteilen zu können. Darüber hinaus wurden die Oberflächeneigenschaften des PEI ebenso auf mikro- und makroskopischer Ebene bestimmt, welche für eine Interaktion mit Endothelzellen entscheidend sind. Hierbei kamen Methoden wie die optische Profilometrie, Strömungspotenzialmessung sowie Tropfenkonturanalyse zur Bestimmung der Kontaktwinkel und Oberflächenenergie zum Einsatz. Vor der Durchführung der Messungen wurden die Proben stets für 30 min in Wasser bzw. Selektionspuffer präinkubiert.

#### 4.3.1. Methoden im Nanometer bzw. atomaren Bereich

##### *Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)*

Die XPS (engl.: *X-ray photoelectron spectroscopy*) stellt eine Methode dar, mit der zerstörungsfrei die elementare Zusammensetzung einer Oberfläche bestimmt werden kann. [163] Dabei können bis auf Wasserstoff und Helium, welche einen zu geringen Wirkungsquerschnitt aufweisen, alle Elemente bis zu einer Informationstiefe von ~10 nm quantitativ nachgewiesen werden. [164] Das Messprinzip beruht auf dem äußeren Photoeffekt, bei dem durch Bestrahlung der Probe mit elektromagnetischen Wellen (meist Röntgenstrahlung aus Al- und Mg-K $\alpha$ -Quellen oder Synchrotronstrahlung) Photoelektronen aus den inneren Atomorbitalen der Oberflächenatome emittiert werden. [165] Diese werden zunächst durch die einfallenden Photonen angeregt, an den Rand des Atoms transportiert und von dort emittiert. Beim Austritt besitzt jedes Photoelektron eine bestimmte kinetische Energie, welche charakteristisch für seine Herkunft ist. Diese kann durch die korrespondierende Bindungsenergie auf das Element bzw. das Orbital des Elementes zurückgeführt werden. Die Detektion von Elektronen einer spezifischen Bindungsenergie und damit eines Elementes wird an einem halbkugelförmigen Analysator realisiert, wobei dieser so eingestellt wird, dass nur Elektronen einer bestimmten Energie ihn passieren können und schließlich über einen Sekundärelektronenvervielfacher detektiert werden. Anhand der Signalintensität (Zählrate) und der spezifischen Energie ist eine quantitative Aussage der Element-

zusammensetzung an der Oberfläche als auch der chemischen Umgebung des emittierenden Elementes möglich. Demnach können XPS Analysen dazu benutzt werden, Veränderungen in der chemischen Oberflächenzusammensetzung oder dem Auftreten neuer Elemente nach einer Funktionalisierung zu bestimmen. [166]

Die XPS wurde angewendet, um die Oberflächenchemie der PEI-Filme hinsichtlich der elementaren Zusammensetzung, vorhandener Oberflächenfunktionalitäten sowie deren mögliche Änderungen durch die Behandlung mit Selektionspuffer und DNS zu ermitteln. Übersichts- und Regionalspektren für prominente Elemente der Polymeroberfläche ( $n = 6$ ) wurden mit einem Kratos Axis Ultra Instrument erstellt, wobei zur Erzeugung des Photonenstrahls eine monochromatische Al-K $\alpha$ -Röntgenquelle (1.486,6 eV) zum Einsatz kam. Die Abtastung der Oberfläche erfolgte für jeden Scan mit 225 W und einer Durchgangsenergie von 160 eV. Das Messareal betrug bei einem 0 ° Detektionswinkel 300 x 700  $\mu\text{m}$ . Die quantitative Analyse der über dieser Fläche gemittelten Intensität emittierter Photoelektronen basierte auf der Fläche fraktionierter Peaks unter Anwendung der Casa XPS Software. (Version 2.3.16, Casa Software Ltd., Teignmouth, UK) Die Intensitäten spezifischer Bindungsenergien wurden für die quantitative Bestimmung von Kohlenstoff (C1s), Sauerstoff (O1s) und Stickstoff (N1s) auf PEI sowie Schwefel (S1s) und Phosphor (P1s) von Oberflächen gebundenen biotinylierten Aptameren verwendet.

### ***Raman Mikroskopie***

Eine weitere spektroskopische Methode für die Ermittlung der chemischen und molekularen Oberflächenzusammensetzung begründet sich auf der Analyse von Molekülschwingungen. Die Raman Spektroskopie basiert auf der Bestrahlung der Probenoberfläche mit elektromagnetischen Wellen bzw. den energetischen Änderungen der emittierten Strahlung nach Absorption. Diese sind auf Änderungen der Schwingungsenergien bestimmter chemischer Bindungen in einer Probe zurückzuführen. Das grundlegende Prinzip ist die Annahme chemischer Bindungen als Federn in einem Kugel-Stab-Modell. Unter dieser Voraussetzung können die im Molekül durch Energieaufnahme hervorgerufenen Vibrationen mit Hilfe des Hook'schen Gesetzes beschrieben werden. Moleküle besitzen abhängig von der Orientierung ihrer Atome und Bindungen, der Masse der Atome sowie der Bindungsordnung verschiedene mögliche Schwingungszustände. Diese Schwingungen können aus einer symmetrischen oder asymmetrischen Dehnung (engl.: *stretching*), einem Verbiegen (engl.: *bending*) oder auch scherenförmigen (engl.: *scissoring*) und schaukelnden (engl.: *rocking*) Deformationen des Molekülgerüsts bestehen. Ob eine Molekülschwingung Raman aktiv ist, hängt stark von den Eigenschaften des Moleküls ab. Allgemein sind Schwingungen, die eine Veränderung der Polarisierbarkeit des Moleküls mit sich bringen, mittels Raman Spektroskopie nachweisbar. Bei Raman-aktiven Molekülen muss demnach durch Erhöhung der Schwingungsenergie eine Änderung in der Größe, Gestalt oder Orientierung der molekularen Elektronenwolke auftreten, wie es beispielsweise bei der symmetrischen, jedoch nicht bei der asymmetrischen Streckerschwingung der Fall ist. Methodisch wird bei der Raman Spektroskopie die Probenoberfläche mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich bestrahlt. Dieses wird von den Molekülen an der Probenoberfläche absorbiert und wieder emittiert. Hierbei kann das Licht auf zwei Arten gestreut werden. Zum größten Teil elastisch (Raileigh Streuung) wobei kein Energietransfer zwischen Photon und Molekül stattfindet. Das heisst, das Molekül

absorbiert die Energie des Photons und gibt diese auch wieder restlos ab. Ein sehr geringer Teil der absorbierten Photonen (ca.  $1/10^6$ ) wird jedoch auch inelastisch bzw. Raman gestreut. Dieser Vorgang ist mit einem Energietransfer zwischen dem Molekül und dem absorbierten Photon verbunden und bewirkt eine geringe Frequenzänderung des emittierten Lichts. Moderne Raman Spektrometer sind darauf spezialisiert das Raileigh-Licht herauszufiltern und nur Raman-gestreute Photonen zu detektieren. Deren Intensität wird im Spektrum als Funktion der Energieunterschiede zur ursprünglichen Lichtenergie aufgetragen. Die Raman Spektroskopie besitzt gewisse Vor- und Nachteile bei der Grenzflächencharakterisierung. Eine wässrige Umgebung ist, anders als bei der IR-Spektroskopie, nicht problematisch und die Proben können in nahezu jedem Zustand gemessen werden. Nachteilig bei der Charakterisierung einer Oberfläche ist, dass die Informationstiefe (je nach den angewendeten Versuchsparametern) mehrere hundert Nanometer bis hinauf in den Mikrometerbereich beträgt. [82, 167, 168] Von daher kann es sich mitunter schwierig gestalten Signale von Funktionalitäten oder vereinzelt Molekülen an der Materialoberfläche zu erhalten.

Die chemische Zusammensetzung der PEI-Filme wurde mit Hilfe eines konfokalen SENTERRA Raman Mikroskops im Mapping Modus analysiert. Informationen über Molekülschwingungen der PEI-Filme ( $n = 6$ ) erfolgten bei RT im wässrigen System (Wasser bzw. Selektionspuffer) mit Rasteranalysen aus  $3 \times 3$  Messpunkten für ein Areal von jeweils  $100 \mu\text{m}$  Kantenlänge. Die Leistung des Lasers ( $532 \text{ nm}$ ) betrug bei den Messungen  $10 \text{ mW}$  und die Integrationszeit des CCD-Detektors  $1 \text{ s}$ . Raman Spektren wurden bei 20-facher Primärvergrößerung für eine Bandbreite zwischen  $70 - 3.700 \text{ cm}^{-1}$  aufgenommen, wobei für jeden Messpunkt 64 Spektren gemittelt wurden, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Zusätzliche Messungen DNS-behandelter PEI Proben wurden mit bis zu 1024 gemittelten Einzelspektren durchgeführt, um Änderungen im Muster der Molekülschwingungen zu detektieren. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Raman aktive Gruppen in der DNS Struktur gelegt. Dazu gehörte die Nukleotid typische Schwingung zwischen  $680 - 780 \text{ cm}^{-1}$  sowie die symmetrische O-P-O Streckerschwingung des DNS Rückgrates bei  $1.602 \pm 9 \text{ cm}^{-1}$ . [169] Die Auswertung der ermittelten Daten wurde mit der Bruker-eigenen OPUS Software (Version 7.5) durchgeführt.

### ***Rasterkraftmikroskopie (AFM)***

Die Topographie einer Materialoberfläche kann ebenfalls viele Informationen über eine erfolgreiche Funktionalisierung liefern sowie bis zu einem gewissen Grad Voraussagen für eine spätere Interaktion von Molekülen mit dieser Oberfläche erlauben. Veränderungen der Oberflächenrauigkeit können als Indiz auf eine kovalente bzw. nicht-kovalente Anbindung von Molekülen oder eine chemische Veränderung der Oberfläche hindeuten. Eine sehr verbreitete Methode zur Bestimmung der Rauigkeit im submikroskopischen Bereich ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl.: *atomic force microscopy*). [59] Das Messprinzip basiert auf einer wenige nm dicken Spitze, welche sich montiert an einen Ausleger zeilenweise über die Probenoberfläche bewegt, um die Oberflächentopographie auf atomarer Ebene zu erfassen. Bei dieser mechanischen Abtastung kann die Messung auf verschiedene Arten erfolgen. In direktem mechanischen Kontakt mit der Materialoberfläche, im Nicht-Kontakt-Modus oder im intermittierenden Modus (sog. *tapping mode*). Die Anwendung einer jeden Methode ist dabei von den gewählten Umgebungsbedingungen abhängig. Veränderungen an der Oberfläche werden anhand der Auslenkung des Auslegers



bestimmt. Dabei wird ein Laser vom Ausleger auf einen Photodetektor reflektiert, wobei minimale Höhenauslenkungen den Reflektionswinkel des Lasers beeinflussen. Durch die zeilenweise Abtastung der Probe wird eine topographische Karte der Materialoberfläche generiert, welche die Grundlage für die Ermittlung der Oberflächenrauigkeit ist. [170] Die vertikale und laterale Auflösungsgrenze dieser Methode reicht, je nach Anwendungsmodus, bis in den subnanometer Bereich. Im Nicht-Kontakt-Modus, welcher im Hochvakuum durchgeführt wird, können beispielsweise Auflösungen bis hin zur bildlichen Darstellung einzelner Atome erreicht werden. [171] Demgegenüber sind mit dem intermittierenden Modus Messungen in Flüssigkeiten und somit unter physiologischen Bedingungen möglich, wodurch dieser für die Untersuchung biologischer Moleküle weite Verbreitung findet. [172, 173] Die Limitationen der AFM liegen zum einen in einem systematischen Fehler begründet. Aufgrund der endlichen Größe der Messspitze wird niemals die reale Probenoberfläche detektiert, sondern lediglich ein Zusammenspiel aus der Geometrie der Spitze und der Topographie des Materials. Des Weiteren ist die mitunter langsame Abtastrate für die Detektion labiler Moleküle problematisch. Weitere Störungen können durch thermische Effekte, Interferenz der zu messenden Probe oder statische Aufladung selbiger auftreten. [174, 175]

Die Oberflächentopographie nativer, Selektionspuffer behandelter und mit Aptameren beschichteter PEI-Filme wurde mittels AFM im *tapping-mode* und einer Abtastrate von 0,3 Hz charakterisiert. Dabei kam ein AFM NanoScope Multi Mode V sowie hochauflösende non-Kontakt Silikon-Nitrite Cantilever (DNP-10) mit einer Federkonstante von  $0,35 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  und einer Resonanzfrequenz von 65 kHz zum Einsatz. Die im wässrigen Milieu abgetasteten Flächen ( $n = 6$ ) maßen jeweils 5, 15 und 50  $\mu\text{m}$  Kantenlänge, um nach Möglichkeit alle Rauigkeit bestimmenden Elemente zu erfassen. [176] Hierbei wurde mit der NanoScope AFM Software (v7.20 R1.30937) sowohl die mittlere ( $R_a$ ) als auch die quadratische Oberflächenrauigkeit ( $R_q$ ) bestimmt.

### 4.3.2. Methoden im mikro- und makroskopischen Bereich

#### *Optische Profilometrie*

Die optische Profilometrie als ein berührungsloses und somit zerstörungsfreies Verfahren zur Vermessung mikroskopischer oder submikroskopischer Oberflächentopographien beruht in den meisten Fällen auf der Methode der Weißlicht-Interferometrie. Hierbei wird nach dem Prinzip des Michelson-Interferometers der kollimierte Strahl einer Lichtquelle mit einer Kohärenzlänge im  $\mu\text{m}$ -Bereich durch einen Strahlteiler in Mess- und Referenzstrahl aufgeteilt, wobei der Messstrahl auf die Probenoberfläche und der Referenzstrahl auf einen Spiegel umgeleitet werden. Das aus beiden Richtungen reflektierte Licht wird am Strahlteiler wieder überlagert und in einem Photodetektor aufgefangen. Eine konstruktive Interferenz aller Wellenlängen und damit eine maximale Intensität für einen bestimmten Messpunkt kann nur auftreten, wenn die optische Weglänge für einen Punkt an der Probenoberfläche mit dem am Referenzarm (Spiegel) übereinstimmt. Ist dies nicht der Fall, zeigt sich für diesen Objektpunkt eine geringere Intensität. Daraus ergibt sich, dass Bildpunkte mit der gleichen Intensität auf der Materialoberfläche auch die gleiche Höhe besitzen müssen. Da mit der optischen Profilometrie innerhalb weniger Sekunden 3D-Oberflächenprofile generiert werden können, liegt der Vorteil dieser Methode klar in der kurzen Messzeit im Vergleich zu taktilen Methoden wie der AFM. Die Auflösungsgrenze der Profilometrie ist mit der

AFM vergleichbar. Jedoch ermöglicht diese Methode die Vermessung größerer Areale bis in den cm-Bereich bei Höhenunterschieden von bis zu 1 mm. Dennoch besitzt auch diese Methode einige Limitationen. Der grundlegende Nachteil ist wie bei allen optischen Methoden, dass sie stark von den optischen Eigenschaften der Probe abhängig ist. [177, 178] Hierbei kann es beispielsweise auf dünnen Filmen oder Glas zu multiplen Streuungs- und Reflektionseffekten kommen, welche zu anormalen Ergebnissen führen können. An dieser Stelle ist diese Methode den taktilen Nachweismethoden klar unterlegen, da Letztere ein eindeutiges Ergebnis liefern. Ebenso können die Messungen nur im Trockenen durchgeführt werden und verhindern somit Analysen unter wässrigen bzw. physiologischen Bedingungen.

Oberflächenprofile und die Rauigkeit im Millimeterbereich ( $R_a$  und  $R_q$ ) von PEI-Filmen wurden mittels des optischen Profilometers MicroProf<sup>®</sup> 200 und der dazugehörigen Software AQUIRE (v1.21) der Firma FRT aufgenommen. Hierbei wurde das gestreute Licht einer Hochleistungs-LED in einer chromatischen Abstandsmessung mit einem hochauflösenden, chromatischen Weißlichtsensor (CWL300) detektiert. Die Phasenverschiebung des an der Polymeroberfläche gestreuten Lichtes wurde im Anschluss mit der MARK III Software (v3.8b) für die Berechnung der Topographie verwendet. Profilometrische Messungen wurden für zwei unterschiedliche Arealgrößen mit einer Messrate von 300 Hz durchgeführt. Zum einen wurden Übersichtsprofile mit  $(4 \times 0,25) \text{ mm}^2$  (4000 Linien pro Bild; 250 Punkte pro Linie;  $n = 3$ ) und zum anderen für, mit dem AFM vergleichbare, Areale von  $(50 \times 50) \mu\text{m}^2$  vermessen. (200 Linien pro Bild; 200 Punkte pro Linie;  $n = 9$ ) Die ermittelten Rohdaten wurden hinsichtlich der Probenneigung in eine Ebene gebracht, durch einen Medianfilter geglättet und invalide Daten diskriminiert. Die Mittelwerte für  $R_a$  und  $R_q$  ergaben sich hierbei aus allen Linienwerten eines gemessenen Areals.

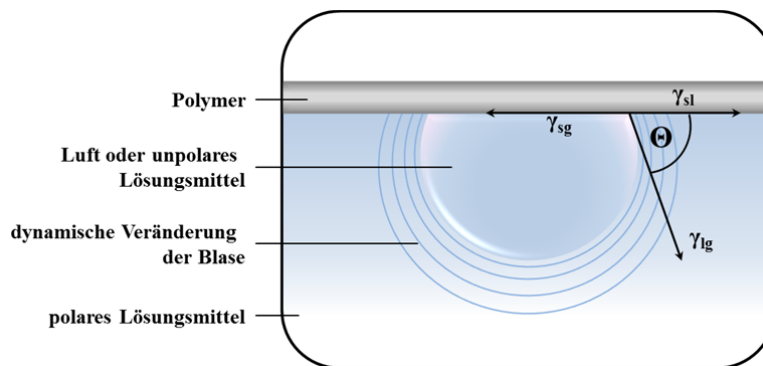
### ***Kontaktwinkelbestimmung mittels Tropfenkonturanalyse***

Erkenntnisse über die Benetzbarkeit der Materialoberfläche lassen sich durch die Bestimmung der Kontaktwinkel in Wasser gewinnen. Diese erstmals von Thomas Young im Jahre 1805 beschriebene Methode [179] beruht auf der Messung des Randwinkels den ein Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche eines Feststoffs (*sessile-drop* Methode) oder eine von unten gegen das Material geführte Luftblase in einem umgebenden Lösungsmittel (*captive-bubble* Methode) zu dieser Oberfläche bildet. Prinzipiell werden durch diese Untersuchungsmethode die Wechselwirkungen an der 3-Phasengrenze zwischen Flüssigkeit, Feststoff und Gas beschrieben. Hierbei werden die Kontaktwinkel mit zunehmender Interaktion bzw. Benetzbarkeit zwischen Flüssigkeit und Festkörperoberfläche kleiner. Dies bedeutet im Fall von Wasser: Umso kleiner die Kontaktwinkel sind, desto hydrophiler die Oberfläche. Da eine Oberflächenmodifizierung durch die Einführung von Funktionalitäten oder weiteren Molekülen meist mit einer Veränderung der Benetzbarkeit verbunden ist, lässt sich dies durch Veränderung des voranschreitenden Kontaktwinkels ( $\Theta_{adv}$ ) makroskopisch bestimmen. Ebenso erlaubt die Differenz zwischen voranschreitendem und zurückziehendem ( $\Theta_{rec}$ ) Kontaktwinkel, welche als Hysterese bezeichnet wird, Rückschlüsse hinsichtlich der Homogenität der Oberfläche. Umso größer die Hysterese ist, desto inhomogener i.d.R. die betreffende Oberfläche. An dieser Stelle ist jedoch zu beachten, dass die Topographie des Materials einen großen Einfluss auf die Benetzbarkeit haben kann. [180]

Die Bestimmung der Kontaktwinkel und damit der Benetzbarkeit der PEI-Filme sowie die Ermittlung der Oberflächenenergie erfolgte dynamisch mit einem DSA 100 der Firma Krüss mittels Captive-Bubble-Methode und verschiedenen Lösungsmittelsystemen. (Wasser-Luft und Wasser-Hexadecan) Gemessen wurden die voranschreitenden ( $\Theta_{adv}$ ) und zurückziehenden ( $\Theta_{rec}$ ) Kontaktwinkel sowohl für native Polymerproben, als auch für solche, die mit Selektionspuffer und Aptameren behandelt wurden. ( $n = 20$ ) Nachfolgend wurde aus der Differenz beider Winkel die Hysterese ermittelt.

Bei der erstmals von Taggart *et al.* [181] angewendeten Captive-Bubble-Methode handelt es sich um eine besondere Messanordnung der Tropfenkonturanalyse, bei der an Stelle eines auf der Polymeroberfläche liegenden Flüssigkeitstropfens eine Luftblase bzw. ein unpolares Lösungsmittel von unten an den Festkörper herangeführt wird. Der Kontaktwinkel wird nach dynamischer Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Blase am tangentialen Schnittpunkt (Dreiphasengrenze) zwischen Tropfenkontur und Materialoberfläche (Basislinie) bestimmt. (Abbildung 10) Die besondere Versuchsanordnung wurde aus drei Gründen ausgewählt.

- Verringerung des mittleren Messfehlers ( $\pm 2^\circ$  [182]) durch Verdunstungseffekte beim Verdampfen der Flüssigkeit aus dem Tropfen sowie Temperaturschwankungen oder Kontaminationen.
- Keine Veränderung der Benetzungseigenschaften des Materials, da es im ständigen Kontakt mit einem polaren Lösungsmittel steht.
- Zugänglichkeit der Oberflächenenergie bzw. dem Anteil beteiligter Komponenten (polar/dispers) von PEI durch Messung in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen (polar/unpolar). [183]



**Abbildung 10. Experimentelles Setup der dynamischen Tropfenkonturanalyse mittels Captive-Bubble-Methode.** Messung des Kontaktwinkels  $\Theta$  an der Dreiphasengrenze. ( $\gamma_{lg}$  = Oberflächenspannung der Flüssigkeit,  $\gamma_{sl}$  = Grenzflächenenergie zwischen Festkörper und Flüssigkeit,  $\gamma_{sg}$  = Oberflächenenergie des Festkörpers)

### ***Oberflächenenergie***

Ergänzt man die in Wasser ermittelten Daten zusätzlich durch Messungen in einem unpolaren Lösungsmittel mit bekannter Oberflächenspannung (z.B. Hexadecan), so ist durch Korrelation beider Datensätze auf indirektem Weg die Oberflächenenergie  $\gamma$  an der Grenzfläche zwischen Lösungsmittel und Materialoberfläche zugänglich. Die freie Oberflächenenergie ist hierbei ein Maß für die Arbeit, welche aufgewendet werden muss, um eine neue Oberfläche an der

Phasengrenze zu erzeugen und wird als Energie pro Flächeneinheit definiert. Der Zusammenhang zwischen Kontaktwinkel, Oberflächenspannung der Flüssigkeit, Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen und der Oberflächenenergie des Festkörpers wird dabei durch die von Young definierten Kriterien hergestellt und kann im Anschluss durch weitere Modelle zur Differenzierung zwischen einzelnen Wechselwirkungskomponenten erweitert werden. [179] Dies kann beispielsweise eine Differenzierung der Anteile dispersiver und polarer Komponenten an der gesamten Oberflächenenergie des Festkörpers und somit einer Einschätzung der Natur wirkender Interaktionen zwischen Lösungsmittel und Materialoberfläche sein.

Der Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel  $\Theta$ , der Oberflächenspannung der Flüssigkeit  $\gamma_{lg}$ , der Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper  $\gamma_{sl}$  und der freien Oberflächenenergie des Festkörpers  $\gamma_{sg}$  lässt sich anhand der Young'schen Gleichung verdeutlichen:

$$\cos \Theta = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}} \quad \longrightarrow \quad \gamma_{lg} \cdot \cos \Theta = \gamma_{sg} - \gamma_{sl} \quad (\text{Gl. 1})$$

Unter Anwendung der Hamilton Methode [183], welche ausgehend von der Young'schen Gleichung das Verhalten zwischen einer Flüssigkeit, einer Feststoffoberfläche und einem Gas an der Grenzfläche im thermodynamischen Gleichgewicht beschreibt, ist die Oberflächenenergie des Festkörpers rechnerisch zugänglich. Dabei sind mindestens zwei unterschiedliche Messungen der Kontaktwinkel mit unterschiedlichen Lösungsmitteln nötig. Auf Basis des Fowkes Modells kann dabei zwischen dispersen (d) und nicht-dispersen (p) Anteilen unterschieden werden.

Nach Fowkes nimmt die Gleichung 1 für die beiden verwendeten Lösungsmittelsysteme folgende Formen an.

$$\gamma_{wg} \cdot \cos \Theta_{wg} = \gamma_{sg} - \gamma_{sw} \quad [\text{Wasser (w) - Luft (g)}] \quad (\text{Gl. 2})$$

$$\gamma_{wh} \cdot \cos \Theta_{wh} = \gamma_{sh} - \gamma_{sw} \quad [\text{Wasser (w) - Hexadecan (h)}] \quad (\text{Gl. 3})$$

Kombiniert man die Gleichungen 2 und 3 miteinander, ergibt sich eine allgemeine Beschreibung für die beiden Lösungsmittelsysteme unter Verwendung zweier reiner, unmischbarer Flüssigkeiten. Hierbei kann an Stelle von Hexadecan auch jedes andere rein disperse Lösungsmittel verwendet werden.

$$\gamma_{wg} \cdot \cos \Theta_{wg} - \gamma_{sg} = \gamma_{wh} \cdot \cos \Theta_{wh} - \gamma_{sh} \quad (\text{Gl. 4})$$

Gleichung 4 enthält mit  $\gamma_{sg}$  und  $\gamma_{sh}$  zwei unbekannte Größen, von denen  $\gamma_{sh}$  durch die Näherung

$$\gamma_{sh} = \gamma_{sg} + \gamma_{hg} - 2\sqrt{\gamma_{sg}^d \cdot \gamma_{hg}^d} - 2\sqrt{\gamma_{sg}^p \cdot \gamma_{hg}^p} \quad (\text{Gl. 5})$$

beschrieben werden kann. Ergänzt man Gleichung 4 mit 5 so ergibt sich

$$\gamma_{wg} \cdot \cos \Theta_{wg} - \gamma_{wh} \cdot \cos \Theta_{wh} + \gamma_{sg} = 2\sqrt{\gamma_{sg}^d \cdot \gamma_{hg}^d} + 2\sqrt{\gamma_{sg}^p \cdot \gamma_{hg}^p} \quad (\text{Gl. 6})$$

Durch die Verwendung einer zweiten Flüssigkeit mit rein dispersiver Oberflächenspannung (z.B. Hexadecan) entfällt der letzte Term der Gleichung 6 und die dispersive Komponente der Oberflächenenergie des Festkörpers  $\gamma_{sg}^d$  kann in zwei Experimenten mit Wasser/Luft und Wasser/Hexadecan berechnet werden.

$$\gamma_{sg}^d = \frac{(\gamma_{wg} \cdot \cos \Theta_{wg} - \gamma_{wh} \cdot \cos \Theta_{wh} + \gamma_{ag})^2}{4\gamma_{hg}^d} \quad (\text{Gl. 7})$$

Nachfolgend ist ebenfalls die Berechnung der nicht-dispersen Komponente möglich.

$$\gamma_{sg}^p = \frac{(\gamma_{wg}(1 + \cos \Theta_{wg}) - 2\sqrt{\gamma_{sg}^d \gamma_{wg}^d})}{4\gamma_{wg}^p} \quad (\text{Gl. 8})$$

Die Berechnung der freien Oberflächenenergie von PEI-Filmen wurde, wie bereits für die Kontaktwinkel beschrieben, für native sowie mit Selektionspuffer und Aptameren behandelte Polymerproben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend hinsichtlich einer Veränderung durch die Versuchsbedingungen als auch die nicht-kovalente Beschichtung mit DNS korreliert.

**Tabelle 2.** Oberflächenspannung der verwendeten Lösungsmittel. [183]

Lösungsmittel	$\gamma_{dispers}$ [mN/m]	$\gamma_{polar}$ [mN/m]	$\gamma_{gesamt}$ [mN/m]
Wasser	21,8	51,0	72,8
Hexadecan	27,5	0	27,5

### **Strömungspotenzialmessungen**

Weitere Informationen hinsichtlich der makroskopischen Ladungseigenschaften einer Grenzfläche sind durch Untersuchungen des Strömungspotenzials erhältlich. Das Messprinzip beruht hierbei auf einem direkten Kontakt des Festkörpers mit einer Elektrolytlösung, welche tangential an der Oberfläche vorbeiströmt. Dabei baut sich als Resultat der Druckdifferenz zwischen Beginn und Ende der Fließstrecke sowie der Materialeigenschaften der festen und flüssigen Phase ein elektrisches Potential auf. Hierbei kommt es zur Ausbildung zweier Schichten. Eine ruhende Schicht nahe der Materialoberfläche, bei der ionisierbare Gruppen stark mit gegenteilig geladenen Ionen der flüssigen Phase interagieren sowie eine zweite mobile Schicht bei der diese Interaktion nur schwach vorhanden ist. Entscheidend ist das elektrische Potenzial an der Grenzschicht zwischen bewegter und ruhender Phase, welches als Zetapotenzial  $\zeta$  definiert wird. [184] An dieser Grenzschicht ist der Festkörper bestrebt, abhängig von den Ladungsverhältnissen an seiner Oberfläche, durch Interaktion mit dem Elektrolyten ein thermodynamisches Gleichgewicht hin zur Elektroneutralität herzustellen. Das Zetapotenzial beschreibt hierbei die Oberflächenladung an der Phasengrenze und kann als ein Indikator für die Oberflächenchemie genutzt werden. [185, 186] Die Oberflächenanalyse mittels Strömungspotenzialmessung ermöglicht jedoch durch pH-Titration nicht nur die Bestimmung des Zetapotenzials sondern ebenso die Ermittlung des isoelektischen Punktes (IEP) der untersuchten Oberfläche.

Tangentiale Strömungspotenzialmessungen wurden mit dem Microslit Electrokinetic Setup [187] durchgeführt, welches mit einer Flachplattenmesszelle ausgerüstet war. [188] Native PEI-Proben

(30 x 56 mm Filme, n = 2) wurden an den Materialrückseiten auf Paraffinfilm festgeklebt, um Nebenströmungen zu verhindern. Mittels eines 230 µm dicken PTFE Spacers zwischen den beiden Probenoberflächen wurde mit Strömungsmessungen die effektive Kanalhöhe von  $60 \pm 5$  µm bestimmt. Dabei wurde ein Kanal mit einer effektiven Probenoberfläche von  $2 \cdot (10 \cdot 20)$  mm<sup>2</sup> für den Elektrolyten geformt. Die Messungen wurden mit wässrigen KCl-Lösungen bei  $22 \pm 2$  °C durchgeführt. Die PEI-Filme wurden zunächst für 8 h in 50 ml einer 1 mM KCl Lösung bei pH = 3, dann für 16 h bei pH = 9 und schließlich wieder für weitere 8 h bei pH = 3 inkubiert. Nach dem Einsetzen der Probe in die Messzelle wurde die Äquilibration mittels frisch hergestellter 1 mM HCl bei pH = 3 komplettiert, indem die Lösung im System mit einem Druckunterschied von 120 mbar zirkulierte, bis der pH und die Leitfähigkeit konstant waren. Während der Messung des Strömungspotenzials wurde der pH-Wert schrittweise in 0,1 Schritten durch die Zugabe von 0,1 M KOH bzw. HCl verändert. Zur Äquilibration nach jeder pH Änderung wurde das System 24 min zirkulieren gelassen, bevor eine neue Messung gestartet wurde. Das Zeta-Potenzial  $\zeta$  wurde aus den Daten des Strömungspotenzials  $dU/dp$  entsprechend der Smoluchowski Gleichung berechnet. [189]

$$\zeta(U_S) = \frac{\eta K_B}{\epsilon_0 \epsilon_r} \cdot \frac{dU_S}{dp} \quad (\text{Gl. 9})$$

Hierbei sind  $\eta$  die dynamische Viskosität,  $K_B$  die elektrische Leitfähigkeit und  $\epsilon_r$  die Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit,  $\epsilon_0$  die Permittivität des Vakuums und  $p$  die Druckdifferenz über dem Spalt. In jedem Fall basierten die Berechnungen auf einer linearen Regression der Daten aus fünf Druckschritten einer jeden Strömungsrichtung zwischen 80 und 120 mbar innerhalb des Messkanals.

### 4.4. Zyto- und endotoxische Evaluierung

#### 4.4.1. Bestimmung der Zellintegrität mittels Laktatdehydrogenase Assay

Der Laktatdehydrogenase Assay (LDH-Assay) ist ein analytisches Instrument zur Analyse der Zellmembranintegrität im Rahmen einer Zytotoxizitätsuntersuchung. Im Detail wird mit einer kolorimetrischen Methode die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase im Überstand von Zellkulturen nachgewiesen. Dieses im Zytosol einer jeden Zelle lokalisierte Enzym katalysiert im Rahmen der Milchsäuregärung, unter gleichzeitigem Verbrauch von NADH, die reversible, enzymatische Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Im Überstand von Zellkulturen dient diese Reaktion in Form ihrer Oxidation als analytischer Parameter für den Nachweis von Zellmembranschädigungen. Zellen, deren Membranintegrität geschädigt ist, setzen LDH ins umgebene Medium frei. Aus diesem kann durch die metabolische Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes in sein farbiges Formazanprodukt auf die Aktivität der LDH und damit die Menge an freigesetztem Enzym geschlossen werden. Hierbei dient das bei der LDH katalysierten Oxidation von Laktat gebildete NADH als Cofaktor. Der Nachweis des Farbstoffes erfolgt über Messung der Absorption bei 492 nm, wobei i.d.R. eine zu bestimmende Probe mit einer nicht geschädigten sowie einer vollständig lysierten Kultur gleichartiger Zellen in Relation gesetzt wird.

Für die Durchführung des Assays wurde direkt vor dem Versuch der LDH-Reaktionsmix (Cytotoxicity Detection Kit LDH) bestehend aus Katalysator und Farbstofflösung frisch angesetzt.

(2,5 µl Katalysator + 112,5 µl Farbstofflösung pro Kavität) Anschließend wurden jeweils 100 µl des Mediumüberstandes in eine Vertiefung einer 96 Kavitätenplatte mit 100 µl des LDH-Reaktionsgemisches vermengt und der gesamte Ansatz für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Absorption bei 492 nm erfolgte nachfolgend mit dem Infinite® 200 PRO Microplate Reader. Als Referenzen wurden stets Proben des Zellkulturmediums als Hintergrundkontrolle, einer auf TCP gewachsenen Zellkultur als Wachstumskontrolle sowie einer direkt vor dem Versuch mit Triton X-100 (0,5 vol-% in PBS) lysierten Kultur als Maximalkontrolle mitgeführt.

### 4.4.2. Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-Assay

Bei diesem analytischen Test handelt es sich ebenfalls um eine kolorimetrische Methode zur indirekten Bestimmung der Zellfunktion, nur dass in diesem Fall nicht die Membranintegrität sondern die metabolische bzw. mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt wird. Der MTS-Assay basiert ähnlich wie der LDH-Assay auf der Metabolisation eines Tetrazoliumsalzes (MTS) in seine reduzierte, farbige Formazanform. Diese Reaktion ist von NAD(P)H abhängig, welches durch mitochondriale Dehydrogenasen im Zelllumen gebildet wird. Da MTS selbst nicht membrangängig ist, wird für den Transport der benötigten Elektronen durch die Plasmamembran Phenaziniummethylsulfat (PMS) als temporärer Elektronenakzeptor genutzt. Der Nachweis des Farbstoffes erfolgt analog des LDH-Assays über Messung der Absorption bei 492 nm, wobei eine Zellprobe mit den gleichen Referenzen wie beim LDH-Assay verglichen wird. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden die beiden Reagenzien MTS und PMS gemischt. (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) Hierfür wurden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten 2,45 µl PMS-Lösung mit 49 µl MTS-Lösung gemischt und jeweils 50 µl direkt auf die Zellkultur (350 µl Medium) gegeben. Nach einer von der Konfluenz der Kultur abhängigen Inkubation von 2 - 3 Stunden unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 vol-% CO<sub>2</sub>) wurden pro Messung 100 µl des Zellkulturüberstandes in eine Vertiefung einer 96 Kavitätenplatte überführt und die Absorption bei 492 nm mit dem Infinite® 200 PRO Microplate Reader gemessen.

### 4.4.3. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)

Um eine mögliche Kontamination des verwendeten Polymerfilms mit Endotoxinen zu detektieren, wurde der LAL-Test mit dem Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™ Kit durchgeführt. Endotoxine sind biochemisch betrachtet Lipopolysaccharide (LPS), welche in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommen. Sie sind thermostabil und behalten ihre toxische Wirkung selbst nach Sterilisation mittels Hitze und Dampf bei. Beim LAL-Test macht man sich die Tatsache zunutze, dass das Lysat aus im Blut des Pfeilschwanzkrebse (lat.: *limulus polyphemus*) vorkommenden Amöbozyten in Anwesenheit von LPS in einer enzymatisch katalysierten Reaktion koaguliert. Beim LAL-Test wird in Anwesenheit von Endotoxinen zunächst ein Enzym im Amöbozyten-Lysat in seine aktive Form überführt, welches nachfolgend die Freisetzung des gelben Farbstoffes p-Nitroanilin (pNA) aus dem farblosen, synthetischen Peptidsubstrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA katalysiert. Die Aktivierungsrate des Enzyms ist dabei direkt von der Endotoxinkonzentration abhängig. Bei der Durchführung des LAL-Tests wird die enzymatische Reaktion nach einer bestimmten Zeit gestoppt und die Menge an freigesetztem Farbstoff photometrisch bei 410 nm bestimmt. Hierbei werden die Absorptionswerte der Probe in Relation

zu denen einer Endotoxin Standardgerade mit bekannter Konzentration gesetzt, wobei die Absorption und die Endotoxinkonzentration im Bereich zwischen 0,1 - 1,0 EU/ml (EU = Endotoxin Units) direkt proportional zueinander sind. Für die Bestimmung des Endotoxingehaltes an der Oberfläche von PEI-Filmen wurden 3 cm<sup>2</sup> des Polymers pro 1 ml Eluat für 72 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen in MEM EAGLE Medium ohne Zugabe von Serum unter ständigem Rotieren bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden pro Probenansatz 50 µl des unverdünnten Eluats nach den Vorgaben des Herstellers analysiert. Als Kontrolle diente das unbehandelte Medium sowie Endotoxin freies Wasser als Hintergrundkontrolle.

### 4.5. Zellbiologische Methoden

#### 4.5.1. Kultivierung von Zellen

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden stets unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank und dafür vorgesehenen Zellkulturgefäßen aus plasmabehandeltem Polystyrol (TCP) bzw. Polypropylen durchgeführt. Alle verwendeten Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden, insofern nicht anders beschrieben, vor der Verwendung auf 37 °C erwärmt. Der Wechsel des Mediums wurde bei den verwendeten Zellarten alle zwei Tage durchgeführt.

Adhärente L929-Fibroblasten (NCTC Klon 929) aus dem Bindegewebe der Maus wurden unter statischen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 vol-% CO<sub>2</sub>) in Standard MEM EAGLE Zellkulturmedium kultiviert. Die Passagierung der Zellen in ein neues Zellkulturgefäß erfolgte bei einer optischen Konfluenz von 90%. Zur Zellpassagierung einer konfluenten 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden die Zellen einmalig mit PBS (-/-) gewaschen, für 3 min mit 1 ml Trypsin/EDTA - Lösung (0,25% Trypsin + 0,53 mM EDTA) versetzt und anschließend im Brutschrank inkubiert. Zum Stoppen des Trypsinierungsvorganges wurden die Zellen in 4 ml MEM EAGLE resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Sedimentation der Zellen für 5 min bei 240 x g wurde der Überstand durch 2 ml frisches Medium ersetzt und die L929 im Verhältnis 1 : 5 in eine neue 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät.

Primäre humane Endothelzellen (HUVEC) wurden kommerziell erworben und unter statischen Zellkulturbedingungen in endotheliale Basalmedium EBM-2 ergänzt mit dem EGM-2 Single Quots<sup>®</sup> Kit zzgl. 2 vol-% FCS (engl.: *fetal calf serum*) kultiviert. Experimentelle Verwendung fanden die Endothelzellen für nicht länger als vier Passagen. Die Überführung der Zellen in eine neue Passage wurde bei einer optischen Konfluenz von etwa 90% durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach dem gleichen Protokoll wie die L929-Fibroblasten isoliert und mit einer Zelldichte von 7.500 Zellen/cm<sup>2</sup> in eine neue Kulturflasche ausgesät.

#### 4.5.2. Quantifizierung der Zellzahl

Nach der Isolierung und Sedimentation wurden die Zellen (L929, HUVEC) in 2 ml Medium resuspendiert und ein 10 µl Aliquot für die Bestimmung der Zellzahl sowie der Zellvitalität mittels Tryphanblau-Färbung entnommen. Dieses wurde mit dem gleichen Volumen des Farbstoffes (Stammlösung: 0,5% in isotonischer NaCl-Lösung) gemischt und 10 µl in eine Countess<sup>™</sup> Messzelle überführt. Die Zellzahl pro ml sowie der Anteil lebender bzw. toter Zellen ergab sich durch Quantifizierung der Zellen in 0,4 µl (Füllvolumen der Messzelle), was einer Auszählung



von vier 1x1 mm Kammern einer Neubauer Zählkammer entsprach. Tryphanblau (auch Benzaminblau) ist ein polyanionischer Azofarbstoff zur Testung der Zellvitalität. [190] Da dieser Farbstoff aufgrund seiner Größe ( $M = 960,8 \text{ g/mol}$ ) und negativen Ladung nicht membrangängig ist, wird er nur von Zellen aufgenommen, deren Zellmembran beschädigt ist. Dies führt dazu, dass tote Zellen durch die Bindung des Farbstoffes an Proteine im Zytoplasma intrazellulär blau gefärbt werden. Die Quantifizierung muss jedoch direkt nach der Zugabe erfolgen, da der Farbstoff nach längerer Inkubation zytotoxisch wirkt.

### 4.5.3. Indirekte zytotoxische Untersuchung mit L929-Fibroblasten

Um einen möglichen Einfluss von eluierenden Substanzen aus den PEI-Filmen auf biologische Systeme zu untersuchen, wurden  $27 \text{ cm}^2$  des Polymers ( $3 \text{ cm}^2$  pro 1 ml Eluat in Übereinstimmung mit der EN ISO 10993-5 und -12 [191]) für 72 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen in 9 ml L929 Kulturmedium (MEM EAGLE) unter ständigem Rotieren bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nachfolgend wurde sowohl das unverdünnte als auch 10-fach verdünntes Extrakt für die Aussaat von L929-Fibroblasten in Mikrotiterplatten (24 Kavitäten) verwendet, wobei pures MEM EAGLE Medium für die Wachstumskontrolle benutzt wurde. Die Aussaatdichte der Zellen betrug  $3 \cdot 10^4$  Zellen/Kavität in einem Volumen von 1 ml Extrakt bzw. MEM. 48 Stunden nach der Aussaat wurde das Wachstum der L929 Zellen morphologisch mittels Phasenkontrast-Mikroskopie in Transmission (Axiovert 40 C) beurteilt. Ebenso wurden die Integrität der Zellmembran und die metabolische Aktivität mit Hilfe eines LDH- und MTS-Assays untersucht. (vgl. 4.4.1./2.)

### 4.5.4. Direkte zytotoxische Untersuchung mit HUVEC

Die zytotoxische Untersuchung der PEI-Filme wurde in einem Direkttest mit primären HUVEC durchgeführt, um die Kompatibilität der Endothelzellen auf diesem polymeren Substrat und damit einen möglichen toxischen Einfluss der Materialoberfläche auf die Zellen beurteilen zu können. Im Direkttest wurden die HUVEC mit einer Zelldichte von  $3 \cdot 10^4$  Zellen/Kavität in einem Volumen von 1 ml EGM-2 Medium auf PEI-Filmen (15 mm Stanzlinge,  $n = 8$ ) in einer Mikrotiterplatte (24 Kavitäten) ausgesät. Die PEI-Filme wurden hierbei mittels Teflonringen am Boden der Kavität fixiert. Als Wachstumskontrolle dienten auf TCP kultivierte Endothelzellen. Die Beurteilung des Zellwachstums erfolgte analog der indirekten Testung 48 Stunden nach der Aussaat durch Untersuchung der Morphologie, Zellintegrität und metabolischen Aktivität.

### 4.5.5. *In vitro* Endothelialisierung von PEI-Filmen

#### *Statisches Modell*

Im statischen Wachstumsmodell wurde untersucht, wie sich primäre HUVEC über einen längeren Zeitraum auf den PEI-Filmen verhalten. Hierfür wurden Endothelzellen analog der direkten zytotoxischen Untersuchung mit  $3 \cdot 10^4$  Zellen/Kavität in Mikrotiterplatten (24 Kavitäten) auf PEI-Filmen (15 mm Stanzlinge,  $n = 8$ ) ausgesät. TCP bzw. Glas dienten als Wachstumskontrolle. Die Vitalität der Zellen sowie die voranschreitende Bildung des Endothelzellmonolayers wurde jeweils nach 2, 7 und 11 Tagen Wachstum mittels Lebend/Tot - Zellfärbung (vgl. 4.5.7.) untersucht. Vor der Färbung wurden von jedem Probenansatz 500  $\mu\text{l}$  des Mediumüberstandes gesichert, zentrifugiert und umgehend bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingelagert. Diese Überstände wurden zu einem

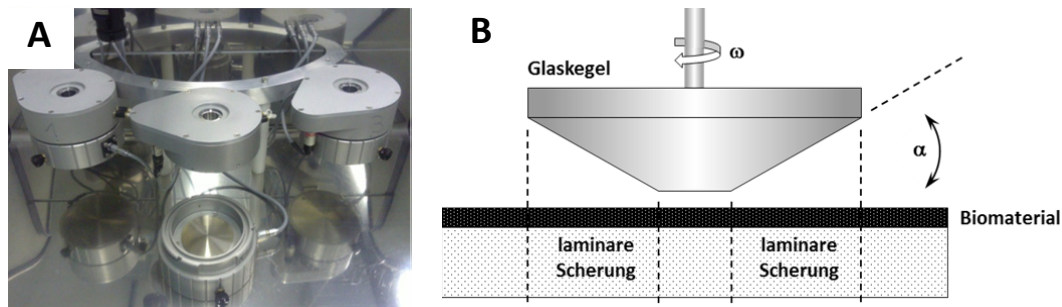
späteren Zeitpunkt für die Quantifizierung vasoaktiver Mediatoren wie Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) als auch pro- und anti-inflammatorisch wirkender Botenstoffe verwendet. (vgl. 4.5.9.) Darüber hinaus wurden die Zellen einiger Probenansätze zur Beurteilung der Zell-Matrix-Interaktionen nach den genannten Zeiträumen fixiert und das Aktin-Zytoskelett sowie fokale Adhäsionskomplexe (Vinkulin) mittels Immunfluoreszenzmethoden gefärbt. (vgl. 4.5.8.) Bei diesem Experiment dienten auf Glas gewachsene HUVEC als Referenz.

### **Dynamisches Modell**

Um das Adhärenzverhalten, die Stabilität und damit die Funktionalität eines Endothelzelllayers auf PEI-Filmen untersuchen zu können, wurde eine „cone-and-plate“ Scherapparat verwendet. Mit dieser rheologischen Methode konnte durch Rotation eines geringfügig angeschliffenen Glaskegels ( $\alpha = 2^\circ$ ) über dem zellbesiedelten, planaren Material ein laminarer Scherstress auf adhärenzte Zellen ausgeübt werden. (Abbildung 11) Die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte konnten dabei über die Beziehung

$$\tau = \frac{\mu \cdot \omega}{\alpha} \quad [\text{dyn/cm}^2] \quad (\text{Gl. 10})$$

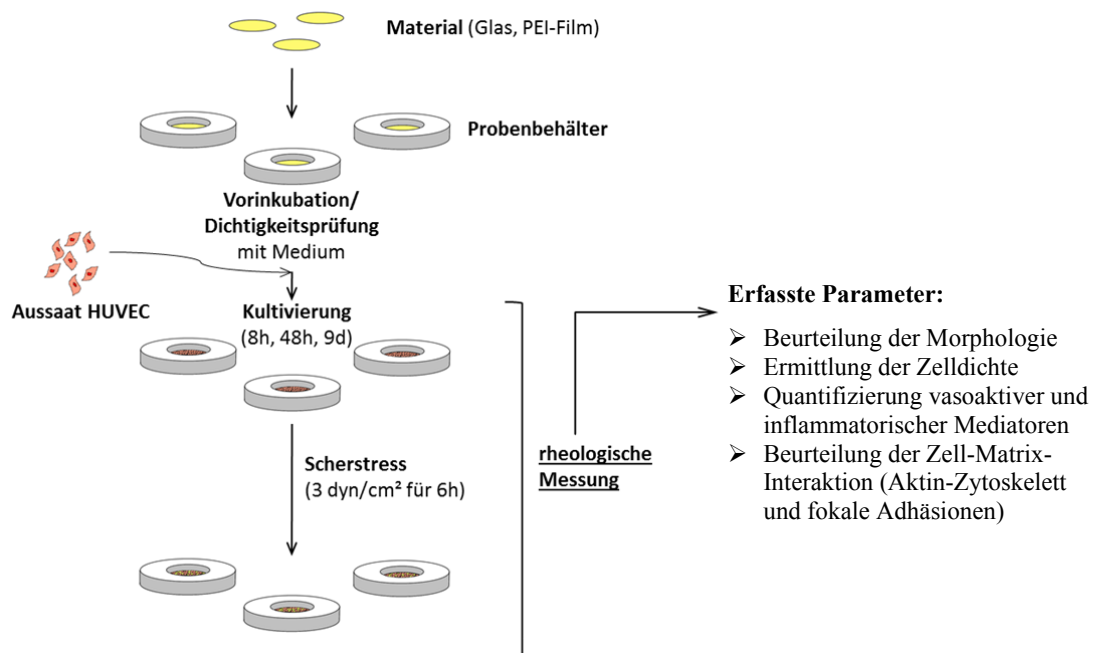
so gewählt werden, dass mit *in vivo* Bedingungen vergleichbare Strömungsbedingungen geschaffen wurden.  $\tau$  ist hierbei die Größe der Strömungsstärke in dyn/cm<sup>2</sup>, welche von der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  und dem Konuswinkel des Glaskegels  $\alpha$  sowie der dynamischen Viskosität des umgebenden Mediums  $\mu$  abhängig ist. [192, 193]



**Abbildung 11. Experimenteller Aufbau (A) und Funktionsprinzip (B) der rheologischen Untersuchung mittels derer die Scherresistenz des Endothelzelllayers auf glatten PEI-Filmen untersucht wurde. (B) Zeigt die relative Position des Glaskegels zum Endothelzelllayer auf dem zu scherenden Biomaterial.**

Für die Durchführung der Studie zur Untersuchung der Scherresistenz humaner Endothelzellen auf PEI wurden glatte PEI-Filme (30 x 30) mm<sup>2</sup> zwischen die beiden Teile eines Polyetheretherketon (PEEK) basierten Rheologie-Probenhalters fixiert. Als Referenzmaterial dienten Glasscheiben ( $\varnothing = 25$  mm). Die Wachstumsfläche innerhalb der Probenhalter entsprach hierbei 4,5 cm<sup>2</sup>. Nachfolgend wurden die HUVEC auf den PEI-Filmen bzw. Glas mit einer Zelldichte von  $1,6 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und damit vergleichbar zum statischen Wachstumsmodell in 1,5 ml EGM-2 Medium ausgesät. (Abbildung 12) Nach 8 h, 48 h und 9 Tagen Wachstum unter statischen Bedingungen wurden die Probenbehälter aus dem Brutschrank entnommen und der Zelllayer bei 37 °C für die Dauer von 6 h Scherkräften von 3 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt. Hierbei wurden von jedem Material zu

jedem betrachteten Zeitpunkt  $n = 6$  unabhängige Proben untersucht. Für die längeren Wachstumszeiten wurde nach dem üblichen Turnus alle zwei Tage sowie 8 h vor dem eigentlichen Scherverversuch das Zellmedium gewechselt. Die Aktivierung der Endothelzellen in der Positivkontrolle (Zugabe von IL-1 $\beta$   $c_{\text{final}} = 10$  ng/ml) wurde ebenfalls 8 h vor dem Scherverversuch durchgeführt, wobei die aktivierten Zellen nicht geschert wurden und lediglich dem Nachweis der Aktivierbarkeit dienen. Nach dem Einsetzen eines Probenbehälters in einen der drei auf 37 °C vorgewärmten Probenköpfe wurde dieser direkt unter einem der Glaskegel montiert. Anschließend wurde die gesamte Probe mittels einer Stellschraube nach oben justiert, bis ein scharfes Bild des Zellrasens den optimalen Abstand zwischen Zellrasen und der Spitze des Glaskegels anzeigte. Nur bei Einhaltung dieses Abstandes war eine laminare Strömungsstärke von 0,3 Pa (3 dyn/cm<sup>2</sup>) bei einer Winkelgeschwindigkeit des Glaskegels von 11,6 rad/s gegeben.



**Abbildung 12.** Experimentelles Setup des dynamischen Wachstumsmodells.

Vor und nach dem jeweiligen Scherexperiment wurden die Morphologie und Zelldichte auf PEI im Vergleich zu Glas mittels des Auflichtkamerasystems QImaging Retiga™ 4000R jeweils mit drei Gesichtsfeldern pro Probe dokumentiert. Ebenso wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts und des Adhäsionsproteins Vinculin nach der Scherung untersucht. Überstände der Zellen wurden jeweils vor und nach der Scherung entnommen, aus diesen die Konzentrationen ausgewählter vasoaktiver sowie inflammatorischer Mediatoren quantifiziert und hinsichtlich eines Einflusses der Scherkräfte auf die auf PEI-Filmen angesiedelten Endothelzellen hin untersucht.

### 4.5.6. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (cLSM)

Die mikroskopische Analyse von Immunfluoreszenzpräparaten wurde mit einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M), montiert auf einem schwingungsfreien Tisch, durchgeführt. Als Lichtquelle fungierte eine HBO100 Quecksilberdampfampe. Die Aufnahme

von zellulären als auch polymeren Präparaten erfolgte für verschiedene Primärvergrößerungen mittels 100x/1,4 DIC, 63x/1,3 Plan-Apochromat, 40x/1,3 Plan-Neofluar, 20x/0,8 Apochromat und 10x/0,3 Apochromat Linsen. Zur Dokumentation wurden die mit einer digitalen AxioCam ICc 5 (D) CCD Kamera aufgenommenen Bilder mit der ZEN desk 2012 Software (Carl Zeiss Microscopy LLC, Thornwood, NY, US) ausgewertet.

### 4.5.7. Vitalitätsfärbung (FDA/PI Fluoreszenzfärbung)

Als Farbstoff zur Detektion vitaler Zellen kam Fluoresceindiacetat (FDA, ex/em 475/535 nm) in einer finalen Konzentration von 25 µg/ml zum Einsatz. Dieser Farbstoff wurde zunächst passiv in seiner inaktiven Form von den Zellen aufgenommen und durch deren metabolische Aktivität nach und nach in seine fluoreszierende Form hydrolysiert. Die Inkubationszeit unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 vol-% CO<sub>2</sub>) nach der Zugabe von FDA betrug etwa 30 min, bevor sich eine ausreichende Menge des aktiven Farbstoffes in den Zellen akkumuliert hatte, um ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal zu liefern. Für den Nachweis toter Zellen innerhalb der Zellkultur wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI, ex/em 488/590 nm) in einer finalen Konzentration von 2 µg/ml verwendet. Dieser Farbstoff ist nur zu einem sehr geringen Teil membrangängig und kann durch passive Aufnahme somit nur genomische DNS von Zellen färben, deren Plasmamembran zerstört ist. Im Rahmen des Vitalitätsnachweises sowie der Bestimmung der Zelldichte wurden stets beide Farbstoffe gleichzeitig zur untersuchenden Zellkultur hinzugegeben und nach der o.g. Inkubation mit dem cLSM bei einer 10-fachen Primärvergrößerung mit jeweils drei Gesichtsfeldern pro Probe detektiert.

### 4.5.8. Immunfluoreszenz Färbung des Aktin-Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionskomplexe

Sowohl im statischen als auch dynamischen Wachstumsmodell wurden exemplarische Proben des Endothelzellrasens hinsichtlich ihrer Interaktionen mit dem unterliegenden Substrat (PEI-Film) untersucht. Dazu wurde das Aktin-Zytoskelett und Vinkulin, eines der Hauptproteine fokaler Adhäsionskomplexe, durch spezifische Färbung mit Fluoreszenz markierten Antikörpern sichtbar gemacht und am cLSM dokumentiert. Nach der statischen oder dynamischen Testung wurden die Zellen aus den jeweiligen Probenkörpern einmalig mit PBS (+/+) gewaschen und anschließend für 30 min bei 4 °C mit Paraformaldehyd (4 vol-% in 0,9% NaCl) fixiert. Danach schloss sich eine zehninütige Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 (0,5 vol-% in PBS (+/++)) sowie das 30-minütige Blocken mit einer 5%-igen BSA-Lösung in PBS (+/+) an. Im nächsten Schritt wurde in einer 2%-igen BSA-Lösung F-Aktin mit Alexa555 Fluoreszenz markiertem Phalloidin (1 : 40) gefärbt, wohingegen Vinkulin zunächst mit einem polyklonalen Maus-anti-Mensch IgG Primärantikörper (1 : 50) über Nacht bei 4 °C markiert wurde. Der Cy2 konjugierte polyklonale Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper (1 : 200) wurde am nächsten Tag für 60 min bei RT mit den Zellproben inkubiert. Zusätzlich zum F-Aktin und Vinkulin wurde ebenfalls die genomische DNS der Zellen in einer fünfminütigen Inkubation bei RT mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 : 5.000) gefärbt und die Proben im Anschluss unter Verwendung von Mowiol auf Glasobjektträgern fixiert. Nach dem Aushärten des Mowioles wurden aussagekräftige Bilder der gefärbten Zellen mittels cLSM in verschiedenen Primärvergrößerungen (20 bis 100-fach) dokumentiert.

### 4.5.9. Sekretionsprofile vasoaktiver und inflammatorischer Mediatoren

Vasoaktive und inflammatorische Zytokine wurden aus den Zellkulturüberständen des statischen und dynamischen Systems quantifiziert. Hierbei wurden die im Überstand enthaltenen Konzentrationen der vasoaktiven Antagonisten Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) mittels des 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>EIA und dem Thromboxane B<sub>2</sub> EIA ELISA-Assays bestimmt. Ebenfalls wurden die Überstände hinsichtlich eines Effektes der PEI-Filme auf die endotheliale Sekretion verschiedener inflammatorischer Zytokine (IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNFα) sowie diverser Wachstumsfaktoren (PDGF-BB, FGF-b, GM-CSF, VEGF) mittels der Bio-Plex Methode untersucht. Für beide Nachweismethoden wurde reines Zellkulturmedium als Negativkontrolle benutzt. Als Positivkontrolle wurden zum Nachweis der Aktivierbarkeit der verwendeten Endothelzellen mit rekombinantem IL-1β (10 ng/ml) aktivierte, TCP-gewachsene HUVEC Kulturen verwendet. Die Aktivierung erfolgte im Fall der statischen Testung 24 h und bei der dynamischen Testung 8 h vor Ablauf der für den Versuch geplanten statischen Wachstumszeit.

#### *Quantifizierung von PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> mittels ELISA-Assay*

Beide Nachweise beruhten auf dem Prinzip eines kompetitiven Immunoassays, bei dem der freie Mediator (PGI<sub>2</sub> oder TXA<sub>2</sub>) in der Probe mit einem gleichartigen, jedoch Acetylcholinesterase (AChE) gekoppelten Mediator (sog. *Tracer*) in Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen an einem entsprechenden Kaninchen-Antikörper stand. Dieser Kaninchen-Antikörper wurde wiederum von monoklonalem Maus-anti-Kaninchen IgG gebunden, welcher bereits als Beschichtung in der Analysenplatte (96 Kavitäten) fixiert vorlag. Da der Tracer immer in gleicher Konzentration bei der Analyse vorlag, hing die Menge seiner Bindung an den Kaninchen-Antikörper umgekehrt proportional von der in der Probe vorliegenden Menge des zu bestimmenden Mediators ab. Hatte der Komplex aus Kaninchen-Antikörper und Mediator (ungeachtet ob frei oder AChE-gekoppelt) an den fixierten Maus-anti-Kaninchen IgG Antikörper gebunden, wurde die Kavität mehrfach gewaschen, um nicht gebundene Substanzen zu entfernen und anschließend Ellman's Reagenz hinzuzugeben. Dieses Reagenz stellte mit 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) ein Substrat für die AChE dar, wobei durch die katalytische Umsetzung der gelbe Farbstoff 5-Thio-2-Nitrobenzoat freigesetzt wurde. Dieser besitzt eine hohe Absorption bei 412 nm. Die spektroskopisch nachgewiesene Intensität des Farbstoffes war dabei proportional zur Menge des Tracers, welche wiederum umgekehrt proportional zur Menge des freien Mediators war. Bei der Durchführung der Assays wurden jedoch PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> nicht direkt nachgewiesen, sondern deren jeweilige Metaboliten, welche in Kulturmedium sehr schnell in einer eins zu eins Reaktion gebildet wurden. Somit wurde an Stelle von PGI<sub>2</sub> seine hydratisierte Form 6-keto Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-keto PGF<sub>1α</sub>) und anstatt TXA<sub>2</sub> sein hydrolysiertes Metabolit Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) detektiert. Die absoluten Konzentrationen dieser Mediatoren wurden in Relation zu entsprechenden Standards ermittelt, wobei diese für 6-keto PGF<sub>1α</sub> im Bereich von 1.000 – 2 pg/ml und für TXB<sub>2</sub> zwischen 1.000 – 8 pg/ml lagen.

#### *Nachweis inflammatorischer Mediatoren und Wachstumsfaktoren mittels Bio-Plex*

Das Prinzip dieser Nachweismethode ist vergleichbar mit einem Sandwich-Immunoassay. Allerdings ist hierbei der Antikörper, welcher den zu quantifizierenden Mediator bindet, an die Ober-

fläche eines fluoreszierenden Partikels gebunden. Das Emissionsspektrum einer jeden Partikelart ist einzigartig und durch die spezifischen Antikörper direkt mit einem bestimmten Mediator verknüpft. (sog. xMAP Technologie) Wird nun ein bestimmtes Partikel mit der Probe inkubiert, fangen die auf ihm gebundenen Antikörper den Mediator ab. In einem zweiten Schritt wird die auf dem Partikel gebundene Menge des Mediators durch die Stärke des Fluoreszenzsignals eines Reportersystem bestehend aus einem biotinylierten Antikörper gegen ein anderes Epitop des Mediators und dem Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin quantifiziert. Durch diese zwei Schritte der spezifischen Anbindung an farbcodierte Partikel und der Quantifizierung auf eben diesen, können eine Vielzahl von Molekülen simultan aus einer Probe quantifiziert werden. Zur Detektion der Partikel sowie der Menge von an ihnen gebundenem Mediator wird ein Durchfluss basiertes System mit zwei Lasern zur Detektion benutzt. Beim Durchfluss werden die Partikel kanalisiert und vereinzelt, um dann durch die Anregung mit dem ersten Laser einem bestimmten Mediator zugeordnet zu werden, während der zweite Laser das quantitative Reportersystem anregt. Die Quantifizierung eines Zytokins aus einer Probe erfolgte bei dieser Nachweismethode in Relation zu einer zuvor vermessenen Referenz mit bekannter Konzentration.

#### 4.6. Molekularbiologische Methoden

##### 4.6.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Vermehrung und strangspezifische Modifikation von DNS-Molekülen wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Hierbei erfolgte die Amplifikation durch eine *Taq*-DNS-Polymerase im dazugehörigen ThermoPol® PCR Puffersystem von *New England Biolabs*. Die PCR-Reaktion diente der exponentiellen Vermehrung von DNS zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligonukleotidprimern. Die Primersequenzen wurden so ausgewählt, dass die Schmelztemperatur im Bereich von  $60 \pm 2$  °C lag und die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Dimeren sowie Haarnadelstrukturen gering war. Die Amplifikation wurde im Rahmen der Zyklusoptimierung in einem Reaktionsvolumen von 50 µl und für die präperative PCR in 100 µl in einem PCR-Thermocycler durchgeführt.

Die Templatmenge pro PCR-Ansatz betrug stets 10 vol-%. Die Anzahl der benötigten Amplifikationszyklen für das beste Verhältnis von Ausbeute und Spezifität wurde für jeden PCR-Lauf mittels Zyklusoptimierung (vgl. Anhang 10.3.) ermittelt. Gleichzeitig wurde stets ein Ansatz ohne Template als Negativkontrolle mitgeführt, um unspezifische Amplifikationen und potenzielle Kontaminationen ausschließen zu können. Nach der PCR wurde ein Aliquot des Produktes zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert. (vgl. 4.6.3./4.)

##### PCR - Komponenten

ThermoPol Puffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer	3,0 µM
Taq - Polymerase (5 U/µl)	1,5 / 50 µl
DNS - Template	variabel

##### PCR - Programm

94 °C	5 min	} variable Zykluszahl
94 °C	30 s	
60 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	5 min	

**Abbildung 13.** Standard PCR-Reaktionsansatz und Amplifikationsbedingungen für die in der *in vitro* Selektion gegen PEI-Film Oberflächen verwendete ssDNS-Bibliothek.

### 4.6.2. Modifizierung der Oligonukleotidbibliothek

In einigen Fällen war es nötig die Bibliothek zu modifizieren, um im Anschluss an die Amplifikation eine Einzelstrangisolierung durchführen zu können oder eine Detektion gebundener Aptamere auf der Polymeroberfläche zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden auf Ebene der PCR bei Bedarf kommerziell erworbene modifizierte Primer eingesetzt. 5'-biotinylierte Primer zur Einführung von Biotin in die Selektionsbibliothek kamen sowohl für den *sense* als auch den *antisense* Strang zum Einsatz. Während der einzelnen Selektionsrunden wurde bei der präparativen PCR der *antisense* Strang zum Zweck der späteren Strangtrennung mittels Immobilisierung an Streptavidin beschichteten Sepharose-Partikeln am 5'-Terminus mit Biotin modifiziert. (vgl. 4.6.8.) Eine 5'-Biotinylierung des *sense* Stranges wurde erst nach Beendigung der SELEX für die Immobilisierung des zellbindenden Liganden nötig. Hierbei wurde die hochaffine Biotin-Streptavidin Interaktion für die nicht-kovalente Anbindung von Streptavidin als Bindeglied zwischen Aptamer und cRGD-Peptid ausgenutzt. Gleichzeitig zur Biotinylierung des *sense* Stranges musste eine andere Methode zur Doppelstrangtrennung eingesetzt werden. Daher wurde der *antisense* Strang am 5'-Terminus mit einer Phosphatgruppe modifiziert, um einen nukleolytischen Abbau dieses DNS-Stranges durch das Enzym  $\lambda$ -Exonuklease (vgl. 4.6.8.) zu ermöglichen. Der Nachweis materialgebundener Aptamere mittels visueller Detektion am cLSM wurde durch die Modifikation des *sense* Stranges am 5'-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor647 erreicht.

### 4.6.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung doppelsträngiger DNS-Moleküle nach ihrer Größe erfolgte in nicht-denaturierenden Agarosegelen. Dieser analytische Arbeitsschritt wurde für die Auswahl des besten Verhältnisses zwischen Spezifität und Ausbeute im Rahmen der Zyklusoptimierung als auch für den Nachweis der spezifischen Amplifikation in der präparativen PCR benutzt. In Anbetracht der mit ca. 100 bp geringen Größe der Oligonukleotide wurde stets ein 3 %-iges Agarosegel durch Einwaage von 1,2 g GTQ-Agarose in 40 ml 1x TAE-Laufpuffer und Erhitzen in einer Mikrowelle hergestellt. Zu der noch warmen Agaroselösung wurden 2,5  $\mu$ l einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und anschließend blasenfrei in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses mit dem Gelschlitten in die Gelkammer überführt und mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet. Erst danach wurden die Kämme gezogen und die Probenaschen auf Beschädigungen überprüft. Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1 : 5 mit DNS-Ladepuffer (5  $\mu$ l DNS-Lösung + 1  $\mu$ l Ladepuffer) gemischt, davon 5  $\mu$ l auf das Gel aufgetragen und die Moleküle mit einer Spannung von 80 V für 1 h getrennt. Als DNS-Längenstandard diente eine DNS-Leiter mit Fragmentgrößen im Bereich von 20 bis 200 bp. (vgl. 5.2.3.)

### 4.6.4. Nachweis von DNS in Agarosegelen

Der Nachweis von DNS in Agarosegelen wurde mittels Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Die Zugabe des interkalierenden Farbstoffes erfolgte bereits bei der Herstellung des Agarosegels. Die visuelle Detektion der Oligonukleotide wurde durch Anregung des Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 302 nm im Transilluminator (MultiDoc-It Imaging System) und Dokumentation mit der „Doc-It® LS Image Acquisition Software“ (UVP, Upland, CA, USA) durchgeführt.

### 4.6.5. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

#### *NukleoSpin Extract II Kit*

Die Reinigung von DNS nach enzymatischen Reaktionen wie der PCR und des  $\lambda$ -Exonuklease katalysierten Strangabbaus erfolgte mittels Silika-Membran-Säulen, welche im sauren Milieu DNS über ionische WW binden und sie im Basischen wieder eluieren. Durchgeführt wurde die Reinigung mit dem *NukleoSpin Extract II Kit*, welches eine Isolierung von Oligonukleotiden bis zu einer minimalen Länge von 65 bp erlaubt. Im Fall einzelsträngiger DNS kam als Bindungsreagenz NTC-Puffer zum Einsatz, der speziell für diese Applikation vorgesehen ist. Die Eluierung der DNS wurde stets mit einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Säule in NE-Puffer durchgeführt.

#### *Gelfiltration zur Entsalzung und zum Pufferaustausch*

Die Entsalzung von einzel- und doppelsträngiger DNS diente der Vorbereitung der DNS-Bibliothek für nachfolgende Selektionsrunden, sowie um potenziell störende Einflüsse von Salzen auf nachfolgende Enzymreaktionen zu eliminieren. Für die Reinigung der Oligonukleotide wurden Säulen mit hochvernetztem Dextrangel (*illustra NAP-5* mit Sephadex™ G-25) verwendet, wobei die Reinigung der kurzen DNS Fragmente auf dem Prinzip des Größenausschlusses beruhte. Somit wanderten kleinere Moleküle und Salze schneller durch die Säule, als die im Verhältnis dazu relativ großen Oligonukleotide. Die DNS wurde in einem Probenvolumen von maximal 500  $\mu$ l auf die Säule gegeben und mit 1 ml Wasser wieder eluiert.

#### *Konzentrierung mittels Ultrafiltration*

Die Methode der Ultrafiltration wurde zur Konzentrierung von ssDNS sowie der Beseitigung letzter Pufferbestandteile durchgeführt. Zu diesem Zweck kamen Amicon®-Filtersysteme mit einem Größenausschluss von 30 kDa (YM-30) zum Einsatz. Die Methode basiert darauf, dass durch Zentrifugation (14.000 x g für 10 min) Moleküle kleiner als 30 kDa die Filtermembran passieren können und nur der zu isolierende Einzelstrang zurückbleibt. Die finale Isolierung der ssDNS erfolgte durch Umdrehen der YM-30 Säulen in neue Eppendorfgeläße und zweifacher Elution mit jeweils 40  $\mu$ l Wasser für eine Minute bei 1.000 x g.

#### *Konzentrierung mittels Vakuumzentrifuge*

Diese Methode der Konzentrierung kam ausschließlich in den Selektionsrunden 5 bis 11 zum Einsatz. In dieser späten Phase der SELEX war das Reaktionsvolumen für die Bindungsschritte mit 250  $\mu$ l derart gering, dass die in Wasser vorliegende ssDNS-Bibliothek aufgrund ihres vergleichsweise großen Volumens für die beabsichtigte eingesetzte Stoffmenge die Pufferverhältnisse im Reaktionsansatz verändert hätte. Um dieser Veränderung der Selektionsbedingungen entgegenzuwirken, wurde die für die Selektion vorgesehene Stoffmenge an ssDNS in ein 2 ml LoBind EppendorfgeläÙ pipettiert und das überschüssige Wasser in der SpeedVac RVC 2-18 für 45 min bei 40 °C und 1.500 rpm im Vakuum fast bis zur Trockne verdampft. Für die Herstellung des Bindungsansatzes wurden im Anschluss 250  $\mu$ l Selektionspuffer (inkl. Kompetitor) hinzugegeben und die Selektionsrunde nach dem beschriebenen Protokoll (vgl. 4.7.4./5.) durchgeführt.



### 4.6.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren

#### *UV-Spektroskopie*

Die Bestimmung der Konzentration von DNS in wässrigen Lösungen erfolgte mittels photometrischer Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $OD_{260}$ ). Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren unbekannter Sequenz bzw. komplexer Gemische, wie sie in der kombinatorischen Bibliothek auftraten, wurden bei einer  $OD_{260}$  von 1 näherungsweise Massenkonzentrationen ( $c_m$ ) von  $33 \text{ } \mu\text{g/ml}$  für einzelsträngige und  $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA zugewiesen. Auf Grundlage dieser Beziehung ließ sich die Massenkonzentration  $c_m$  in g/l von DNS in Lösung über

$$c_m = OD_{260} \cdot 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot f \quad (\text{Gl. 11})$$

bestimmen, wobei  $f$  den Verdünnungsfaktor darstellt.

Weitergehend konnte ebenso die Stoffmengenkonzentration  $c_n$  in mol/l über die Beziehung

$$c_n = c_m / M \quad (\text{Gl. 12})$$

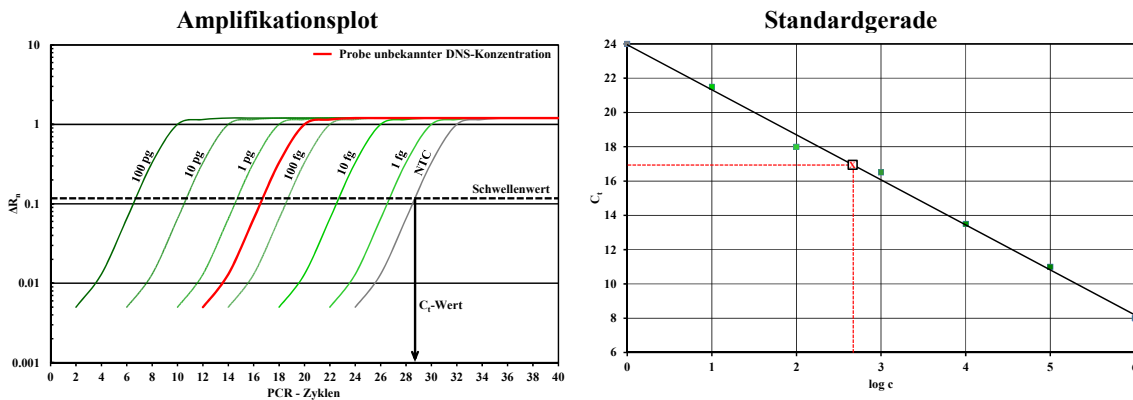
mit Hilfe des Molekulargewichtes  $M$  und der Massenkonzentration bestimmt werden. Das durchschnittliche Molekulargewicht des enthaltenen synthetischen Oligonukleotids war hierbei durch den Hersteller bereits ermittelt worden, ließ sich jedoch auch anhand des durchschnittlichen Molekulargewichtes eines Nukleotids von  $330 \text{ g/mol}$  und der Sequenzlänge des Oligonukleotids ermitteln. Die photometrische Messung wurde mit einem Volumen von  $60 \text{ } \mu\text{l}$  zumeist unverdünnter DNS-Lösung in Polystyrol-Küvetten (UVette™) mit einer Schichtdicken von  $1 \text{ cm}$  im UV-Spektrometer durchgeführt. Abgesehen von der  $OD_{260}$  wurde ebenfalls die Absorption bei  $280 \text{ nm}$  dokumentiert. Proteine besitzen bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum, wodurch aus dem Quotienten beider Werte ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) Rückschlüsse über die Reinheit der DNS gezogen werden konnten. Reine DNS-Lösungen wiesen Werte im Bereich von  $1,8 - 2,0$  auf, wohingegen niedrigere Werte auf eine Verunreinigung hindeuteten.

#### *Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)*

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren, welche methodisch auf der klassischen Polymerasekettenreaktion beruht. Der Unterschied zur üblichen PCR ist, dass während des PCR-Laufes in Echtzeit eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen spezifisch amplifizierten Nukleinsäuren möglich ist. Die Quantifizierung der absoluten enthaltenen Menge an DNS ist hierbei durch die Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes wie Ethidiumbromid oder SYBR Green I möglich. Das Fluoreszenzsignal nimmt hierbei proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu und wird stets am Ende der Elongation eines PCR-Zyklus detektiert. Um die in einer Probe enthaltene Ausgangsmenge an Template bestimmen zu können, wird für die Auswertung nach dem PCR-Lauf (40 Zyklen) nur das Fluoreszenzsignal in der exponentiellen Phase der PCR zur Quantifizierung genutzt. Nur in dieser Phase der PCR sind die Reaktionsbedingungen annähernd optimal und die Proportionalität zwischen Templatmenge und Fluoreszenzsignal ist gegeben. Um stets das Fluoreszenzsignal in der exponentiellen Phase der PCR zu nutzen, wird in der nachfolgenden Auswertung die

Änderung des gemessenen Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) über der Zyklenzahl aufgetragen. Die exponentielle Phase zeigt sich dann anhand eines linearen Anstieges des  $\Delta R_n$  über mehrere Amplifikationszyklen hinweg. (Abbildung 14) In diesem linearen Bereich wird für alle vermessenen Proben ein Schwellenwert festgelegt. Der Schnittpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal einer Amplifikation erstmals diesen Schwellenwert überschreitet, wird als  $C_T$ -Wert (engl.: *cycle threshold*) definiert. Eine quantitative Aussage über die anfänglich in einer Probe enthaltene Menge an Template ist nun vergleichend mit Hilfe einer Standardgeraden von Proben mit bekannter Ausgangstemplatemenge möglich. Die linear, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und den gemessenen  $C_T$ -Werten der Standards lässt sich graphisch auftragen und anhand der entstehenden Gerade die Geradengleichung entnehmen. Mit Hilfe dieser Gleichung kann für jede unbekannte Probe des gleichen PCR-Laufes die Ausgangsmenge an Template bestimmt werden, insofern es sich um das gleiche Template handelt.

Die Methode der qPCR wurde für die Überwachung des Selektionsfortschrittes im Rahmen der PEI-SELEX sowie bei nachfolgenden Bindungsexperimenten für die Quantifizierung der Aptamerbindung an das Polymer verwendet. Hierbei wurden die in den Proben enthaltenen DNS-Ausgangsmengen stets in Relation zu einer Reihe von Standardverdünnungen der DNS-Startbibliothek im Bereich von 100 pg/ $\mu$ l bis 1 fg/ $\mu$ l gesetzt. Die zu quantifizierenden Proben aus Bindungsexperimenten (vgl. 4.7.5./6.) lagen stets in 500  $\mu$ l Eluat vor, wobei die Bindungsexperimente mit zwei PEI-Stanzlingen ( $\varnothing = 6$  mm) in Doppelbestimmung ( $n = 2$ ) durchgeführt wurden. Für den qPCR-Lauf wurde jedes dieser Eluate in drei unabhängigen PCR-Ansätzen quantifiziert und die absoluten DNS-Mengen am Ende der Auswertung gemittelt. In jedem PCR-Ansatz ( $V_{ges} = 20$   $\mu$ l) war 1  $\mu$ l des unverdünnten Eluats als Template enthalten. Zusätzlich bestand ein PCR-Ansatz aus dem „ready to use“- Mix des SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (final 1x), dem Forward- und Reversprimer (0,3  $\mu$ M final) sowie Wasser. Die Messungen wurden stets mit einem StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR Gerät durchgeführt.



**Abbildung 14. Exemplarische Darstellung und Auswertung eines qPCR-Laufes.** Ermittlung des  $C_T$ -Wertes einer Amplifikation anhand des Schwellenwertes (links) sowie Bestimmung der Ausgangsmenge an Template mittels der Standardgeraden aus Proben mit bekannter Ausgangskonzentration.

### 4.6.7. Sequenzierung von Oligonukleotiden

Die innerhalb der ssDNS-Bibliothek aus Selektionsrunde elf angereicherten PEI-Film bindenden Aptamere wurden mittels Brückenamplifikation (v3 Sequenzierchemie, Illumina HiSeq 1500) in zwei 100 bp „paired-end“ Läufen sequenziert. Zur Datenanalyse wurden die Sequenzen im Anschluss um die Adaptersequenzen und konstanten Bereiche der SELEX-Primer gekürzt und ins Fasta Format konvertiert. Die Aufklärung prominenter Sequenzmotive wurde mit 100.000 Sequenzen mittels des DREME Algorithmus [194] durchgeführt. Hierbei wurde der Zufallsbereich aller Sequenzen hinsichtlich sich wiederholender 49mer Motive analysiert. Der verwendete Algorithmus wurde spezifisch für die Motivanalyse großer Datensätze entwickelt. Er beseitigt Limitationen wie eine unzuverlässige Unterscheidung zwischen funktionellen Motiven und statistischen Artefakten und erlaubt den Vergleich zwischen mehreren großen Datensätzen. Im Gegensatz zu vielen anderen Analysewerkzeugen ist er dabei bedeutend schneller und akkurater bei der Analyse multipler, sehr kurzer, nicht-redundanter und statistisch unterschiedlicher Sequenzmotive.

### 4.6.8. Einzelstranggenerierung und -isolierung

#### *DNS Doppelstrangtrennung mittels Biotin - Streptavidin Interaktion*

Im Rahmen einer jeden Selektionsrunde wurde die in der präoperativen PCR generierte doppelsträngige DNS an Streptavidin beschichtete Sepharose-Partikel (*Streptavidin Sepharose™ High Performance Beads*) immobilisiert und nachfolgend der *sense* Strang im Basischen eluiert. Zu diesem Zweck wurde in der PCR ein 5'-biotinylierter Primer für den Gegenstrang eingesetzt. Bei der Strangtrennung wurden 200 µl der beschichteten Partikel in ein leeres und mit einem Filter verschlossenes DNS-Syntheseröhrchen pipettiert und diese zwecks Herauswaschen des Lösungsmittels (80% Ethanol) und Sedimentation mit 2,5 ml PBS (-/-) gewaschen. Anschließend wurde der vollständige PCR-Ansatz dreimal über die Säule gegeben. Der nachfolgende Waschschritt wurde erneut mit 2,5 ml PBS durchgeführt. Die Eluierung des *sense* Stranges und damit der angereicherten ssDNS-Bibliothek erfolgte anschließend durch Trennung des DNS-Doppelstranges mittels Zugabe von 500 µl NaOH-Lösung (200 mM). Für die Vorbereitung der angereicherten Bibliothek für eine nachfolgende Selektionsrunde wurde der isolierte *sense* Strang nachfolgend mit Sephadex Röhrchen (NAP-5) in Wasser umgepuffert und durch Ultrafiltration konzentriert.

#### *Nukleolytischer Abbau des phosphorylierten Gegenstranges mittels λ-Exonuklease*

Der nukleolytische Abbau von dsDNS mit Hilfe des Enzyms λ-Exonuklease wurde für die Generierung von einzelsträngiger, 5'-biotinylierter DNS für die Materialbindungsversuche sowie den Aufbau des Aptamer-cRGD basierten Endothelialisierungssystems eingesetzt. Hierfür wurde in einer vorangehenden PCR-Amplifikation für den *antisense* Strang ein 5'-phosphoylierter Primer verwendet. Nach der Reinigung des doppelsträngigen PCR Produktes mit anschließender Umpufferung in Wasser und Konzentrierung der dsDNS wurde die exakte Menge an enthaltener dsDNS mittels UV-Spektroskopie ermittelt und anhand dieser der enzymatische Abbau berechnet. Hierbei wurden stets für den nukleolytischen Abbau von 1 µg dsDNS 10 Einheiten (*units*) des Enzyms eingesetzt. Der Abbau des phosphorylierten *antisense* Stranges erfolgte für 30 min bei 37 °C mit anschließender zehnmütiger Inkubation bei 80 °C zur Inaktivierung des Enzyms. Der

verbliebene *sense* Strang wurde nachfolgend mittels Silika-Membran-Säulchen (*NukleoSpin Extract II Kit*) gereinigt und die Ausbeute an einzelsträngiger DNS quantifiziert.

### 4.7. *In vitro* Selektion

#### 4.7.1. Design der kombinatorischen Oligonukleotidbibliothek

Ein wichtiger Aspekt für die erfolgreiche Durchführung der PEI-SELEX war das Design der kombinatorischen DNS-Startbibliothek sowie der korrespondierenden Primer. Die verwendete einzelsträngige DNS-Bibliothek hatte eine Sequenzlänge von 91 Basen. Hierbei entfielen 50 Basen auf den mittigen Zufallsbereich, welcher von den konstanten Primersequenzen flankiert wurde. (Abbildung 15) Der randomisierte Bereich wurde aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der Basen bei der Synthese mit einer Mischung aller Basen im Verhältnis dA(3) zu dG(2,5) zu dC(2,5) zu dT(2) derart gestaltet, dass statistisch betrachtet alle Basen äquimolar in der Sequenz vorhanden waren. Die Komposition der ssDNS-Bibliothek wurde bewusst im Bereich eines Molekulargewichtes von ~30 kDa gewählt, um eine spätere Isolierung der Einzelstrang-DNS zu erleichtern.

##### ssDNS-Startbibliothek

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG -(N)<sub>50</sub>- GAT GGA CGA ATA TCG CTC CC-3'

##### FORWARD Primer

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG-3'

##### REVERSE Primer

5'-GGG AGC GAT ATT CGT CCA TC-3'

**Abbildung 15.** Basensequenz der DNS-Startbibliothek und der korrespondierenden Primer

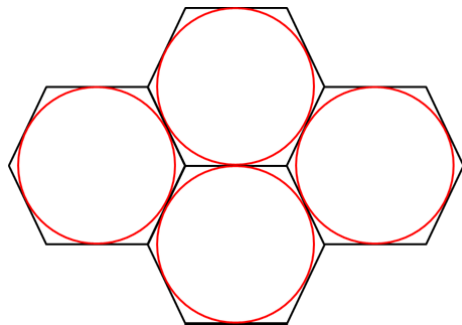
Entscheidend für eine effektive Selektion und Amplifizierbarkeit der Bibliothek war das Primerdesign. Anhand der Sequenz ließen sich hierbei bestimmte Eigenschaften der Primer steuern. Besonders wichtig waren die Schmelztemperatur sowie das Bestreben der Sequenzen Haarnadelstrukturen bzw. Homo- und Heterodimere zu bilden. Die zuletzt genannten Eigenschaften sollten nach Möglichkeit vermieden werden, da diese sich nachteilig auf die Spezifität der Selektion und Amplifikation auswirken können. Ebenso sollte aus Gründen der Spezifität die Schmelztemperatur beider Primer im gleichen Bereich von  $60 \pm 2$  °C liegen. Dies ermöglichte eine Verwendung der Primer sowohl bei der Standard PCR als auch bei der späteren absoluten Quantifizierung des Selektionsfortschrittes mittels quantitativer RealTime PCR (qPCR). Für die Überprüfung der biophysikalischen Eigenschaften wurden die kreierten Sequenzen vorab mittels bioinformatischer Berechnungen analysiert. (OligoAnalyzer 3.1, Integrated DNA Technologies Inc.) [195] Mit Hilfe der in diesem bioinformatischen Werkzeug verwendeten Algorithmen war eine Abschätzung der Eigenschaften und Hybridisierungskinetiken möglich. [196]

#### 4.7.2. Festlegung der experimentellen Rahmenbedingungen

Nach Synthese der generierten Sequenzen war der nächste Schritt der Aufbau und die Optimierung des Amplifikationssystems. Hierbei musste die Amplifizierbarkeit der ssDNS-Bibliothek überprüft und das PCR-Protokoll für eine spezifische Amplifikation bei ausreichender Ausbeute etabliert werden. (vgl. Anhang 10.3.) Nachfolgend war für die Festlegung der experimentellen

Rahmenbedingungen während der SELEX eine Abschätzung der maximal möglichen Aptamer- menge pro  $\mu\text{m}^2$  nötig, um die bei jeder Selektionsrunde einzusetzende DNS Menge festlegen zu können. Die grundlegenden Annahmen für diese Abschätzung waren:

- eine uniforme, monolagige Gleichverteilung der Aptamere an der Oberfläche
- gefaltete Aptamere haben eine Größe von 3 - 5 nm [97, 98]
- Aptamere liegen als Kreise bzw. Kugeln in maximaler Flächenbelegung vor (hexagonale Kreisgitterpackung)



Hexagon:

$$\text{Innenkreisradius: } r_1 = \frac{a}{2} \cdot \sqrt{3}$$

(a = Seitenlänge)

$$\text{Seitenlänge: } a = \frac{r_1 \cdot 2}{\sqrt{3}}$$

$$\text{Fläche: } A = \frac{3}{2} a^2 \cdot \sqrt{3}$$

Aptamere als Kreis			Aptamere als Hexagon		
$\varnothing_{\text{Aptamer}} [\text{nm}]$	A [ $\text{nm}^2$ ]	$r_1 [\text{nm}]$	a [ $\text{nm}]$	$A_{\text{Hexagon}} [\text{nm}^2]$	$N_{\text{Aptamere}} [\mu\text{m}^2]$
3	7,1	1,5	1,7	7,8	128.304
4	12,6	2,0	2,3	13,9	72.192
5	19,6	2,5	2,9	21,7	46.181

**Abbildung 16.** Prinzip der hexagonalen Kreisgitterpackung als Grundlage zur Berechnung der Anzahl bindender DNS-Moleküle für eine maximale Flächenbelegung.

**Tabelle 3.** Eingesetzte DNS Stoffmengen im Verhältnis zur angebotenen PEI-Film Oberfläche für die einzelnen Selektionszyklen.

SELEX Runde	DNS [pmol]	DNS [N]	Material [Ø in mm]	$A_{\text{gesamt}} [\mu\text{m}^2]$	Verhältnis $N/\mu\text{m}^2$	Überschuss DNS*
1	5.000	$3,0111 \cdot 10^{15}$	2 · 13	$5,30 \cdot 10^8$	5.681.321	44x
2	200	$1,2044 \cdot 10^{14}$	13	$2,65 \cdot 10^8$	454.491	4x
3	200	$1,2044 \cdot 10^{14}$	13	$2,65 \cdot 10^8$	454.491	4x
4	200	$1,2044 \cdot 10^{14}$	10	$1,57 \cdot 10^8$	767.134	6x
5	200	$1,2044 \cdot 10^{14}$	8	$1,01 \cdot 10^8$	1.192.475	10x
6	200	$1,2044 \cdot 10^{14}$	6	$5,65 \cdot 10^7$	2.131.681	17x
7	300	$1,8066 \cdot 10^{14}$	6	$5,65 \cdot 10^7$	3.197.522	26x
8	300	$1,8066 \cdot 10^{14}$	4	$2,51 \cdot 10^7$	7.197.610	57x
9	300	$1,8066 \cdot 10^{14}$	4	$2,51 \cdot 10^7$	7.197.610	57x
10	300	$1,8066 \cdot 10^{14}$	3	$1,41 \cdot 10^7$	12.812.766	102x
11	300	$1,8066 \cdot 10^{14}$	3	$1,41 \cdot 10^7$	12.812.766	102x

\* im Vergleich zu theoretisch gesättigter Oberfläche bei 3 nm Aptamergröße ( $128.304 / \mu\text{m}^2$ )

Unter Anwendung dieser Parameter wäre eine Sättigung der Materialoberfläche bei einer Aptamerbindung zwischen 50.000 - 130.000 Aptameren pro  $\mu\text{m}^2$  erreicht. Anhand der Abschätzung der minimal benötigten Anzahl von DNA-Molekülen ( $\emptyset = 3 \text{ nm}$ ) für eine flächendeckende Aptamerbindung wurde das Verhältnis zwischen angebotener PEI-Oberfläche (Zielstruktur) und verfügbaren Aptameren für jede Selektionsrunde definiert. Ziel war es, den Selektionsdruck über den Verlauf der *in vitro* Selektion hinweg zu erhöhen und damit die Anreicherung PEI-Film bindender DNS-Sequenzen zu forcieren. (Tabelle 2)

### 4.7.3. Verringerung der Hintergrundbindung

Vor der Durchführung der SELEX musste ein geeigneter Kompetitor ausgewählt werden. Kompetitoren aus DNS oder RNS dienen standardmäßig bei einer *in vitro* Selektion dazu, die Anreicherung unspezifisch bindender Sequenzen durch intermolekulare Interaktionen wie komplementäre Basenpaarung sowie hohen molekularen Überschuss zu verhindern. Besonders entscheidend ist dies innerhalb der ersten Selektionsrunden, da in diesen ein möglicherweise spezifisch bindendes Aptamer nur zu einem äußerst geringen Prozentsatz enthalten ist und es durch unspezifisch bindende Sequenzen leicht aus der Selektionsbibliothek verdrängt werden könnte. Für die geplante SELEX gegen PEI wurden tRNS der Hefe (lat.: *Saccharomyces cerevisiae*) und Lachssperma DNS als potentielle Kompetitoren auf ihre Funktion und Effektivität hin getestet. Weiterhin wurde die passende Konzentration des Kompetitors ermittelt, bei der die unspezifische Bindung ausreichend unterdrückt wird, jedoch noch genügend Sequenzen an das Polymer binden können, um eine spätere Amplifikation zu ermöglichen. Für die Durchführung wurden Bindungsansätze mit jeweils 500 fmol der ssDNS-Bibliothek und verschiedenen Kompetitorkonzentrationen (10 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) mit PEI-Filmen unter Selektionsbedingungen inkubiert und die am Material gebundenen Sequenzen der Selektionsbibliothek mittels qPCR quantifiziert.

### 4.7.4. 1. Selektionsrunde

Die erste Selektionsrunde gegen die PEI-Film Oberfläche wurde mit 5 nmol der Startbibliothek durchgeführt. Hierfür wurden 5  $\mu\text{l}$  einer 1  $\mu\text{M}$  DNS-Lösung mit dem Selektionspuffer zzgl. dem Kompetitor t-RNA der Hefe (100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und nachfolgend zur Denaturierung für 5 min auf 95 °C im Thermoschüttler erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis für 5 min gekühlt und damit renaturiert. (sog. *snap cooling*) Nach einer erneuten fünfminütigen Äquilibration bei RT erfolgte der erste Selektionsschritt gegen PEI durch Zugabe von jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Bibliothek auf zwei Materialstanzlinge ( $\emptyset = 13 \text{ mm}$ ) in einer Polystyrol Zellkulturplatte (TCP) mit 24 Kavitäten und anschließender Inkubation für eine Stunde bei RT unter vorsichtigem Schwenken (150 rpm) auf einem MTS 2/4 Orbitalschüttler. Bereits während der Vorbereitung der DNS wurden die PEI-Stanzlinge stets für 30 min in Selektionspuffer ohne Kompetitor vorinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Stanzlinge aus dem Bindungsansatz entnommen und für einen einminütigen Waschschrift in eine neue Kavität mit 1 ml Selektionspuffer (ohne Kompetitor) überführt. Anschließend wurden die Filme mit den gebundenen Aptameren in 2 ml LoBind Eppis überführt und die ssDNS mit 250  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O für 10 min bei 95 °C im Thermoschüttler unter starkem Schütteln (650 rpm) vom Material eluiert. Die PEI-Filme wurden anschließend aus den Elutionsfraktionen entfernt und verworfen. Beide Eluate wurden im Anschluss vereinigt ( $V_{\text{ges}} = 500 \mu\text{l}$ ) und die gesamte Lösung in einer ersten PCR-

Reaktion eingesetzt, wobei der Volumenanteil des Templates bei 50% lag. Die PCR wurde in 10 Ansätzen mit jeweils 100 µl für acht Zyklen durchgeführt, der gesamte PCR-Ansatz im Anschluss vereinigt und als erster selektierter Pool bei -80 °C in 100 µl Aliquots eingelagert. Von dieser ersten angereicherten Bibliothek wurde zunächst, in Vorbereitung auf die präperative PCR, eine Zyklenoptimierung im Bereich zwischen 6 und 14 Amplifikationszyklen (Entnahme nach 6, 8, 10, 12 und 14 Zyklen) bei einem Volumenanteil des Templates von 10% des 50 µl PCR-Ansatzes durchgeführt und anschließend das beste Verhältnis zwischen Ausbeute und Spezifität mittels Gelelektrophorese analysiert. Die präperative PCR zur Vermehrung der aus der Selektionsrunde isolierten Sequenzen wurde nachfolgend mit der optimierten Zyklenzahl, bei gleichem Volumenanteil des Templates, für 10 PCR-Ansätze à 100 µl durchgeführt und das doppelsträngige PCR-Produkt erneut im Agarosegel überprüft. Für beide PCR-Reaktionen wurde ein 5'-biotinylierter Reversprimer für die spätere Einzelstrangisolierung eingesetzt. Die Isolierung des *sense* Stranges der angereicherten Bibliothek wurde direkt mit dem doppelsträngigen Produkt der präperativen PCR wie unter 4.6.5 und 4.6.8. beschrieben mit Streptavidin beschichteten Sepharose-Partikeln sowie anschließender Umpufferung und Konzentrierung durchgeführt. Anhand nachfolgender UV-spektroskopischer Quantifizierung konnte das in der nächsten Selektionsrunde einzusetzende Volumen bei geplanter Stoffmenge von 200 pmol der Selektionsbibliothek berechnet werden.

### 4.7.5. Selektionsrunden 2 - 11

Die Vorgehensweise bei den nachfolgenden Selektionsrunden entsprach zum Großteil dem bereits in der ersten Selektionsrunde beschriebenen Protokoll. Lediglich die eingesetzte Stoffmenge der aus der vorangegangenen Selektionsrunde angereicherten Bibliothek sowie die Fläche an verfügbarem Polymer wurden im Rahmen eines stetig steigenden Selektionsdruckes während der SELEX variiert. Ebenso verhielt es sich mit dem Reaktionsvolumen des Selektionsansatzes sowie der Anzahl und Dauer der Waschschriffe nach der Selektion. Nach der zweiten Selektionsrunde wurde bereits ein Gegenselektionsschritt gegen das umgebende polymere Material (TCP) eingeführt, der ab der fünften Runde auf weitere im biomedizinischen Sektor verwendete Polymere (Polystyrol (PS) und Polyethylen-co-vinylacetat (PEVA)) erweitert wurde. Die Maßnahmen zur Erhöhung der Stringenz sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Ab einem Durchmesser des Materialstanzlings von 8 mm wurde die Selektion in 2 ml LoBind Tubes durchgeführt, da so eine bessere Handhabung der Filme möglich war und diese durch Fixierung auf einer Kanüle mittig im Bindungsansatz in der Schwebe gehalten werden konnten. Die Gegenselektion wurde ebenso um dieses Material erweitert. Des Weiteren wurde auf Ebene der Amplifikation nach dem Selektionsschritt stets eine Zyklenoptimierung mit nachfolgender präperativer PCR durchgeführt. Die Aufarbeitung der angereicherten Bibliothek verlief im Anschluss wie für die erste Selektionsrunde beschrieben.

### 4.7.6. Überwachung des Selektionsfortschrittes

Für die Überwachung des Selektionsfortschrittes während der *in vitro* Selektion und somit der schrittweisen Anreicherung PEI bindender Sequenzen in der ssDNS-Bibliothek wurde ab der vierten Selektionsrunde jeweils alle zwei Runden die Bindung der Aptamere an die Polymeroberfläche mittels qPCR quantifiziert. (vgl. 4.6.6.) Hierbei wurde stets das gleiche Verhältnis von angereicherter Bibliothek zum PEI (50 pmol ssDNS auf einem 6 mm Stanzling) verwendet und

die absolute Bindung mit den vorangegangenen Selektionsrunden als auch der Ausgangsbibliothek in Relation gesetzt.

### 4.7.7. Detektion und Visualisierung der Aptamerbindung auf PEI

#### *Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)*

Die qPCR wurde auch bei weitergehenden Bindungsexperimenten für die Beurteilung der Aptamerbindung an PEI-Filme verwendet. Dies war zum Beispiel bei der Evaluierung einer Materialelektivität der angereicherten Aptamere oder beim Aufbau des Aptamer basierten Systems zur Unterstützung der initialen Adhärenz von Endothelzellen auf PEI-Filmen der Fall. Für diese Bindungsversuche wurden stets 20 pmol der angereicherten Bibliothek mit 4 mm PEI-Stanzlingen unter Standard-Selektionsbedingungen inkubiert.

#### *Kontaktwinkelmessung und Oberflächenenergie*

Die Bindung von Aptameren der angereicherten Bibliothek aus Selektionsrunde elf wurde anhand der Veränderung der Benetzungseigenschaften auf den PEI-Filmen nachgewiesen. Für den Nachweis wurden 100 pmol der angereicherten Bibliothek nach dem Standardprotokoll für Bindungstests mit 13 mm Stanzlingen des PEI-Films für 30 min bei RT inkubiert und nachfolgend die Kontaktwinkel in Wasser/Luft sowie Wasser/Hexadecan wie unter 4.3.2. beschrieben im Vergleich zu nativen und Selektionspuffer behandelten PEI-Filmen bestimmt. (n = 20)

#### *Visualisierung der Aptamer - Materialbindung mittels cLSM*

Die Visualisierung einer erhöhten Materialbindung der Aptamere nach der elften Selektionsrunde wurde mit Hilfe einer AlexaFluor647-Fluoreszenzmarkierung der ssDNS ermöglicht. Der Vorteil dieses Farbstoffes lag in seinem Absorptions-/Emissionsbereich bei langen Wellenlängen (ex/em 635/670 nm) sowie des hohen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 239.000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Diese Faktoren sorgten für eine geringe Hintergrundfluoreszenz des Polymers sowie ein starkes Fluoreszenzsignal der markierten ssDNS. Zur Markierung wurden die Aptamere in einer präparativen PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert, gereinigt und einem Standardbindungstest (50 pmol ssDNS auf einem 6 mm PEI-Stanzling) zugeführt. Nach den Inkubations- und Waschschritten des Bindungstests wurden die PEI-Stanzlinge mit dem cLSM in verschiedenen Primärvergrößerungen hinsichtlich eines Fluoreszenzsignals der gebundenen Sequenzen analysiert. Als Kontrollen dienten hierbei unbehandelter PEI-Film zur Bestimmung und Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz des polymeren Materials, sowie die ebenfalls AlexaFluor647 modifizierte Ausgangsbibliothek zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundbindung von ssDNS. Um eine vergleichende Aussage über die Fluoreszenzintensität treffen zu können, wurden die Einstellungen am cLSM hinsichtlich Laserintensität und elektronischer Nachverstärkung so gewählt, dass das unbehandelte Polymer nur noch ein minimal detektierbares Restsignal abgab. Diese Einstellungen wurden im Anschluss auf alle Proben angewendet.



#### IV. METHODEN

**Tabelle 4.** Übersicht der Veränderungen des Selektionsprotokolls zur Steigerung der Stringenz innerhalb der PEI-SELEX.

SELEX Runde	DNS [pmol]	Gegenselektion*			Selektion			Waschschritte	
		A [mm <sup>2</sup> ]**	V [μl]	t [min]	A [mm <sup>2</sup> ]**	V [μl]	t [min]	V [μl]	t [min]
1	5.000	---	---	---	532	2 x 500	60	2 x 1.000	1
2	200	2x24 well TCP	2 x 500	30	266	1.000	60	2 x 1.000	1
3	200	2x24 well TCP	2 x 500	30	266	1.000	60	2 x 1.000	5
4	200	2x48 well TCP	2 x 250	30	157	500	45	2 x 1.000	5
5	200	133	250	30	101	250	45	2 x 1.000	10
6	200	133	250	30	57	250	30	2 x 1.000	10
7	300	133	250	30	57	250	30	3 x 1.000	15
8	300	133	250	30	25	250	30	3 x 1.000	15
9	300	133	250	30	25	250	20	3 x 1.000	20
10	300	133	250	30	14	250	20	3 x 1.000	20
11	300	133	250	30	14	250	20	3 x 1.000	20

\* von Runde 2 - 4 nur TCP als Selektionsgefäß für Gegenselektion; anschließend 2 ml LoBind Tubes (Polypropylen, PP) und je 66,4 mm<sup>2</sup> PS und PEVA

\*\* angebotene Gesamtfläche (Ober- und Unterseite); Fläche ergibt sich aus der Größe der Materialstanzlinge

### 4.7.8. Sequenzaufklärung und Bindungsmotive

Mit dem aus der Sequenzierung und anschließenden Datenanalyse erhaltenen Datensatz wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich der bindenden Sequenzmotive durchgeführt. Hierzu kamen bioinformatische Werkzeuge zur Sequenzanalyse (mfold webserver 3.2 (The RNA Institute, Albany, NY, USA) [197] und ClustalW2 (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK) [198, 199]) zum Einsatz. Die zehn am häufigsten innerhalb der Selektionsbibliothek aus Runde elf angereicherten Motive wurden näher betrachtet. Um Aussagen hinsichtlich homologer Sequenzbereiche zwischen den angereicherten Aptamerfraktionen treffen zu können, wurden die Motive des gesamten Zufallsbereiches vergleichend angeordnet und mittels phylogenetischer Analysen hinsichtlich Sequenzähnlichkeiten untersucht. Darüber hinaus wurde die zweidimensionale Faltung der vollständigen Aptamersequenzen (Zufallsbereich + Primersequenzen) für definierte Umgebungsbedingungen nach thermodynamischen Kriterien berechnet. Diese Simulationen wurden mit Ionenstärken monovalenter Kationen von 145 mM und divalenter Kationen von 1,5 mM jeweils für Temperaturen von 4, 20 und 37 °C durchgeführt.

### 4.8. Statistik und Fehlerbetrachtung

Alle präsentierten Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung kontinuierlicher Variablen und wurden mittels zweiseitigem t-Test für gepaarte Proben analysiert. Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde hierbei als signifikant angesehen.

## 5. MATERIALIEN

### 5.1. Geräte und Materialien

#### 5.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
AFM (NanoScope, Multi Mode V)	Bruker Nano GmbH (Berlin, Deutschland)
Agarose Gelkammer	BioRad (Hercules, CA, USA)
Autoklav FVA A1	INTEGRA Biosciences (Chur, Schweiz)
Axiovert 40 C	Carl Zeiss AG (Stuttgart, Deutschland)
BioPhotometer (UV-Spektrometer)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Biofuge primo R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
cLSM (LSM 510 META)	Carl Zeiss AG (Stuttgart, Deutschland)
„cone-and-plate“ Scherappatur	SmardCAD GmbH (Ulm, Deutschland)
Countess™ automated cell counter	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DSA 100	A.KRÜSS Optronic GmbH (Hamburg, Deutschland)
Flockeneisautomat AF20	Scotsman Industries Inc. (Vernon Hills, IL, USA)
Galaxy Mini Tischzentrifuge	VWR International (Radnor, PA, USA)
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
HERAsafe (ZK-Bench)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
HP 5890 Series II GC	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA)
HP 7694 Headspace-Sampler	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA)
Infinite® 200 PRO Microplate Reader	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
konfokales SENTERRA Raman Mikroskop	Bruker Optik GmbH (Ettlingen, Deutschland)
Kratos Axis Ultra (XPS)	Kratos Analytica (Manchester, Großbritannien)
Kühlschrank: 4°C	Liebherr GmbH (Bulle, Schweiz)
-20°C	Liebherr GmbH (Bulle, Schweiz)
-80°C (HERAfreeze)	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Microslit Electrokinetic Setup	ZetaSCIENCE GmbH (Dresden, Deutschland)
MicroProf® 200	Fries Research & Technology GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Milli-Q Dest. Wasser Anlage	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
MTS 2/4 digitaler Orbitalschüttler	IKA-Werke GmbH (Staufen, Schweiz)
MultiDoc-It Digital Imaging System	UVP (Upland, CA, USA)
Multipette stream	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
MyCycler 580BR 7842 (PCR Cycler)	BioRad (Hercules, CA, USA)
Nanoquant Plate™	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
OLYMPUS OMCL AC200TS-R3	Olympus Corporation (Shinjuku, Tokio, Japan)
PEEK-Probenhalter (Rheologie)	SmardCAD GmbH (Ulm, Deutschland)
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences (Chur, Schweiz)
Pipetten (Eppendorf Research & Research plus)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Power Pac HC (Netzteil)	BioRad (Hercules, CA, USA)
Silikon-Nitrite Cantilever (DNP-10)	Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland
SpeedVac RVC 2-18	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

T Gradient 96X0  
Thermoblock  
Tischzentrifuge

Clemens GmbH (Lindlar, Deutschland)  
Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)  
Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

### 5.1.2. Verbrauchsmaterial

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
Amicon Ultra-0,5 mit Ultracel-30 Membran	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
Biopsy Punch 3, 4, 5, 6, 8 mm	GlaxoSmithKline GmbH (London, Großbritannien)
CellCrown™ inserts 48 Kavitäten	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Countess™ Messzellen	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Deckgläschen (15 mm)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)
DNA LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
DNA LoBind Tubes (2,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
DNA Synthesis Columns (1µm) + Ersatzfilter	Glen Research Corporation (Glen Rock, PA, USA)
Einwegkanülen Microlance™ 3 (0,5 x 16 mm)	BD - Biosciences (San Jose, CA, USA)
Glasscheiben (Ø 24 mm)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland)
GTQ Roti® Agarose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
illustra NAP-5 Columns Sephadex™ G-25 DNA Grade	General Electric (Fairfield, CT, USA)
Immersionsöl 518F	Carl Zeiss AG (Stuttgart, Deutschland)
KIMTECH Science (Wischtücher)	Kimberly-Clark Professional (Dallas, TX, USA)
Klarsichtflachbeutel Papier/Folie (Autoklavierbeutel)	SteriCLIN GmbH (Tübingen, Deutschland)
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
MicroAmp® Optical 8-Cap Stripes	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
MultiGuard® Tips (10, 20, 200, 1000 µl)	Sorenson BioScience Inc. (Murray, UT, USA)
Pasteurpipetten (230 mm, Glas)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
PEI ULTEM® 1000 (Pellets)	General Electric (Fairfield, CT, USA)
PEVA ELVAX 460A	Du Pont (Wilmington, DE, USA)
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
PS 158k	BASF (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland)
Superfrost-OT (76 x 26 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25, 50 ml)	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Streptavidin Sepharose™ High Performance Beads	General Electric (Fairfield, CT, USA)
UVette Küvetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm²)	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Kavitäten)	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen (6 und 10 cm)	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)

### 5.1.3. Chemikalien

Artikel	Hersteller	Qualität
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)	Chromatographie
deuteriertes Chloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)	p.a. (99,8 at-%)
Dichlormethan (DCM)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	p.a. (99,9% Reinheit)
Ethanol (reinst.)	Th. Geyer GmbH (Renningen, Deutschland)	p.a. (99,8% Reinheit)
Hexadecan	Merck (Darmstadt, Deutschland)	Chromatographie
Kupferchlorid (CuCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)	ACS, Reag. Ph. Eur.
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Mowiol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	pur. (≥ 95%)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)	puriss. (> 99%)
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)	pur. (≥ 95%)

### 5.1.4. Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Artikel	Hersteller
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
cRGD - Peptid (c[RGDfK (Biotin-PEG-PEG)])	Peptides International Inc. (Louisville, KY, USA)
Interleukin-1β (10 ng/ml)	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)
λ-Exonuklease (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Streptavidin (FITC; 0,5 mg/ml)	BD Pharmingen (San Jose, CA, USA)
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs GmbH (Ipswich, MA, USA)
tRNA Hefe	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
UltraPure™ Salmon Sperm DNA Solution	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

## 5.2. Synthetische Oligonukleotide und verwendete Längenmarker

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) kommerziell erworben. Je nach geplantem Experiment waren die Primer mit verschiedenen 5'-Modifikationen wie Phosphorylierung, Biotinylierung oder AlexaFlour647-Fluoreszenzmarkierung modifiziert.

### 5.2.1. Kombinatorische ssDNS-Bibliothek und Primer

#### SELEX-Startbibliothek (ssDNS, 91 mer):

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG -(N)<sub>50</sub>- GAT GGA CGA ATA TCG CTC CC-3'

#### 5'-Forward Primer (ssDNS, 21 mer):

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG-3'

#### 3'-Revers Primer (ssDNS, 20 mer):

5'-GGG AGC GAT ATT CGT CCA TC-3'

### 5.2.2. Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4

Der Zufallsbereich der Aptamere wurde unterstrichen dargestellt

#### PEI-1 (ssDNS, 90 mer)

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG CGC GCA ATA TCT TCA TTT TCT TTG TTT TTT TTC  
TCG TAT TTC ATG CCG GGA TGG ACG AAT ATC GCT CCC-3'

#### PEI-2 (ssDNS, 90 mer)

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG GAC ACC CAT CCG CGT TAC TTC TTC TTT CAT TTT  
TTC TTG TTC TTG CGA GGA TGG ACG AAT ATC GCT CCC-3'

#### PEI-3 (ssDNS, 90 mer)

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG CGG CCA CCC TAG CAT TTC CTT TTC TTT ACC TTT  
TTT TTC CTC GCG AGG GGA TGG ACG AAT ATC GCT CCC-3'

#### PEI-4 (ssDNS, 90 mer)

5'-GGG AGA AAT TCC GAC CAG AAG GGC CGA GCG GTC TTA CAT TCT TTT CAT TTC TTT  
ACA CTT CAT TTA CCG CGA TGG ACG AAT ATC GCT CCC-3'

### 5.2.3. DNA-Längenmarker

20 bp-DNA-Leiter der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) mit 10 Fragmenten im Bereich von 20 - 200 bp. (Fragmentlängen: 20, 40, 60, 80, **100**, 120, 140, 160, 180, **200** bp)

### 5.3. Eukaryotische Zelllinien und Primärzellen

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
L929 - Fibroblasten	Fibroblasten Zelllinie aus dem Bindegewebe der Maus. Einsatz im Rahmen der Zytotoxizitätsuntersuchung.	NCTC Klon 929 von ATCC (LGC Standards GmbH, Teddington, Großbritannien)
HUVEC	Primäre, humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene. Testsystem für Endothelialisierung polymerer Biomaterialien.	Clonetics™ primäre HUVEC (Lonza Group AG, Basel, Schweiz)

### 5.4. Kommerzielle Kits zur molekularbiologischen Analyse

Artikel	Hersteller
6-keto-Prostaglandin F1 $\alpha$ EIA Kit	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
Bioplex™ Cytokine Assay	BioRadLaboratories Inc. (Hercules, CA, USA)
Bio-Plex Pro Human Cytokine Group I 27-Plex	
Bio-Plex Pro Human Cytokine IL-1ra Set	
Bio-Plex Pro Human Cytokine PDGF-BB Set	
Bio-Plex Pro Human Cytokine Basic FGF Set	
Bio-Plex Pro Human Cytokine Standards Group I 27-Plex	

Bio-Rad Protein Assay Kit I	BioRad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)
Cytotoxicity Detection Kit LDH	F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS assay)	Promega (Fitchburg, WI, USA)
Limulus amebocyte lysate (LAL) test QCL 1000 <sup>™</sup>	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II - Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Thromboxane B2 EIA Kit	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)

### 5.5. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

#### 5.5.1. Kulturmedien und Lösungen für Zellkulturarbeiten

Bezeichnung	Hersteller
EBM-2 endotheliales Basalmedium	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
EGM-2 Single Quots <sup>®</sup> Kit	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
MEM (Eagle) Flüssigmedium	Biochrom AG (Cambridge, Groß Britannien)
Triton X-100 (0,5 vol-% in PBS)	Fluka (St. Gallen, Schweiz)
Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin+0,53 mM EDTA)	ATCC (Manassas, VA, USA)

#### 5.5.2. Puffer- und Stammlösungen

Kommerzielle Puffer	Hersteller
DNS-Ladepuffer (6x)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NTC - Puffer	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS (-/-) und (+/+))	Biochrom AG (Cambridge, Groß Britannien)
Rotiphorese <sup>®</sup> 10x TAE-Puffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
ThermoPol <sup>®</sup> PCR Reaktionspuffer (10x)	New England Biolabs GmbH (Ipswich, MA, USA)

### 5.6. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

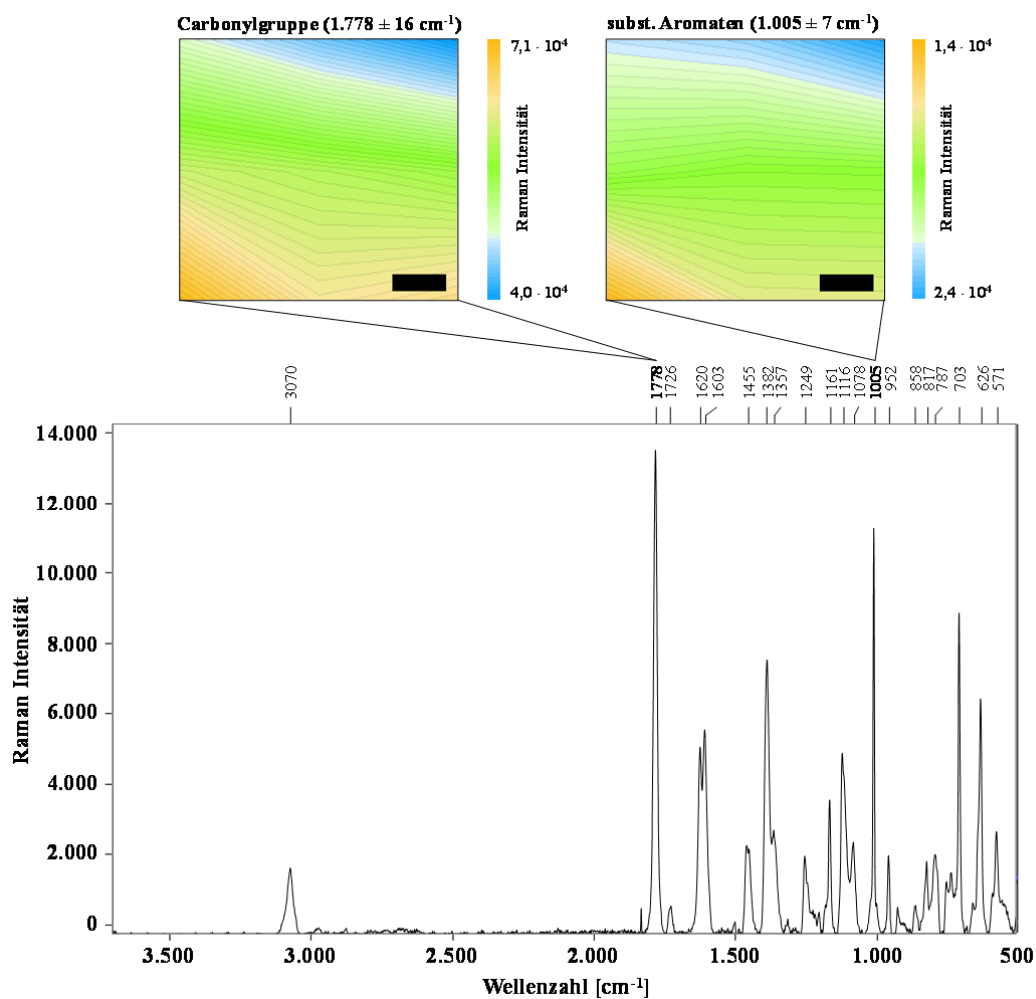
Name	Verwendung	Verdünnung	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Fluoreszenzmarkierung genomischer DNS	1 : 5.000	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cy2-konjugierter, polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG	Sekundäntikörper gegen Maus IgG	1 : 200	Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, PA, USA)
Fluoresceindiacetat (FDA)	Fluoreszenzmarkierung lebender Zellen	25 µg/ml	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Phalloidin-Alexa555 (Molecular Probes <sup>®</sup> )	Fluoreszenzmarkierung des Aktin Zytoskeletts	1 : 40	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
polyklonaler Maus-anti-Human Vinkulin IgG	Vinkulin bindender Primäntikörper	1 : 50	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Propidiumjodid (PI)	Fluoreszenzmarkierung toter Zellen	2 µg/ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

## 6. ERGEBNISSE

## 6.1. Grenzflächencharakterisierung nativer PEI-Filme auf nano bzw. atomarer Ebene

Die Charakterisierung der Oberfläche wurde nicht nur für PEI-Filme sondern ebenso für die in der Gegenselektion verwendeten Polymere durchgeführt. Die betreffenden Daten sind als Übersicht im Anhang aufgeführt. (vgl. Anhang 10.2.)

Für die Bestimmung der chemischen bzw. atomaren Oberflächenzusammensetzung wurden die PEI-Filme mittels XPS und Raman Spektroskopie analysiert. Die Messungen an verschiedenen Orten der Polymeroberfläche wiesen bei beiden Methoden auf keine nennenswerten Inhomogenitäten in der atomaren bzw. molekularen Oberflächenzusammensetzung von PEI hin.



**Abbildung 17. Raman Spektrum der PEI-Filme.** Repräsentatives Übersichtsspektrum der analysierten PEI-Film Oberfläche sowie Kartierung prominenter Strukturelemente über eine Fläche von 100 x 100 µm. (Maßstab: 20 µm)

Die Raman-spektroskopischen Analysen zeigten ein deutliches Signal für die symmetrische Molekülschwingung der Carbonylfunktion bei 1.778 cm⁻¹ sowie die C,C-Gerüst- und C-H-Valenz-

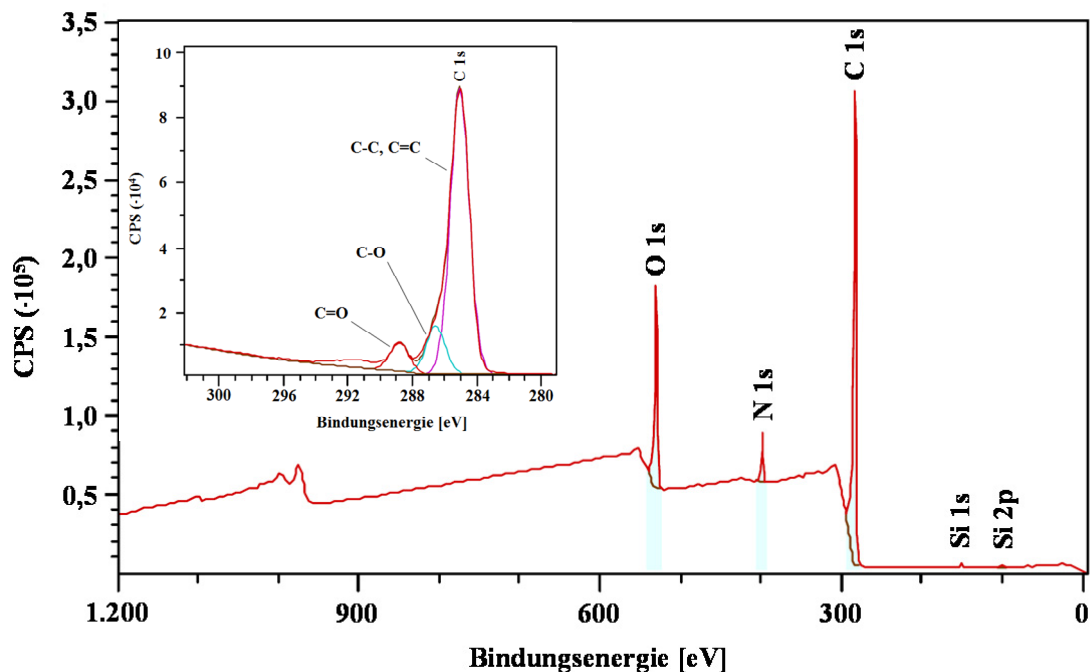


schwingungen der aromatischen Systeme. (Abbildung 17 & Tabelle 5) Dazu gehörte ein starkes Signal der Ringschwingung substituierter Aromaten bei  $1.005\text{ cm}^{-1}$  und zwischen  $1.603 - 1.620\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-C}$ ) sowie die C-H-Valenzschwingungen bei  $3.070\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{CH}$ ). Ebenfalls waren deutliche Signale der gesättigten aliphatischen Komponenten ( $\nu_s$  und  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$  zwischen  $2.800 - 3.000\text{ cm}^{-1}$ ) zu erkennen. Es gab keinen Hinweis auf Schwingungen sekundärer Aminogruppen ( $\nu\text{NH}$ ) bei  $3.300\text{ cm}^{-1}$ , welche auf eine partielle Öffnung der Phthalimidgruppen und die Existenz von Carboxylgruppen als Oberflächenfunktionalitäten hinweisen würden. Die korrespondierenden Kartierungsuntersuchungen der PEI-Oberfläche zeigten homogene Intensitäten der beschriebenen Molekülschwingungen im gesamten Messareal, was auf eine gleichförmige chemische Zusammensetzung der PEI-Filme hindeutete. Die erkennbaren Intensitätsunterschiede bei der Kartierung prominenter Molekülschwingungen der Carbonylgruppe ( $1.778\text{ cm}^{-1}$ ) und der substituierten Aromaten ( $1.005\text{ cm}^{-1}$ ) ergaben sich durch die Verschiebung der Fokusebene, da PEI aufgrund der geringen Dicke nicht vollständig plan auflag und stets minimal gewölbt war.

**Tabelle 5. Zuordnung der Molekülschwingungen aus den Raman Spektren der PEI-Filme.** (vgl. Abbildung 17)

Peak [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Schwingung	
<b>3.070</b>	aromatische C-H-Valenzschwingung ( $\nu\text{CH}$ )	$3.200 - 3.000\text{ cm}^{-1}$
	minimale Signale Valenzschwingungen gesättigter aliphatischer Gruppen ( $\nu_s$ & $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ )	$3.000 - 2.800\text{ cm}^{-1}$
<b>1.778</b>	Carbonylschwingung ( $\nu\text{CO}$ )	$1.900\text{ cm}^{-1}$ bis $1.550\text{ cm}^{-1}$
<b>1.620</b> <b>1.603</b>	aromatische Ringschwingungen ( $\nu\text{CC}$ )	$1.620\text{ cm}^{-1}$ bis $1.400\text{ cm}^{-1}$
1.455	asymmetrische Deformationsschwingung für Alkane ( $\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$ )	$1.460 \pm 10\text{ cm}^{-1}$
<b>1.382</b>	Symmetrische Deformationsschwingung für verzweigte Alkane ( $\delta_s\text{CH}_3$ ). Sehr schwaches Signal, da von aromatischen Gerüstschwingungen überlagert und eher IR als Raman aktiv.	Duplett bei: $1.372\text{ cm}^{-1}$ bis $1.368\text{ cm}^{-1}$ $1.389\text{ cm}^{-1}$ bis $1.381\text{ cm}^{-1}$
1.161	asymmetrische Valenzschwingung der C-O-C-Gruppe ( $\nu_{\text{as}}\text{COC}$ )	$1.150\text{ cm}^{-1} - 1.060\text{ cm}^{-1}$
<b>1.116</b>	schwache Bande für CN-Valenzschwingung ( $\nu\text{CN}$ )	$1300\text{ cm}^{-1}$ bis $1000\text{ cm}^{-1}$
<b>1.005</b>	starke charakteristische Bande für mono-, meta- und 1,3,5-trisubstituierte Aromaten	$\sim 1.000\text{ cm}^{-1}$
858	symmetrische Valenzschwingung der C-O-C-Gruppe ( $\nu_s\text{COC}$ )	$890\text{ cm}^{-1}$ bis $830\text{ cm}^{-1}$
<b>703</b>	aromatische C-H Deformationsschwingung (out of plane) ( $\delta\text{CH}$ )	$900\text{ cm}^{-1}$ bis $670\text{ cm}^{-1}$

Die aus den Übersichtsspektren der XPS ermittelte atomare Zusammensetzung entsprach hinsichtlich der prozentualen Anteile an C, N und O den erwarteten Referenzwerten sowie der chemischen Struktur. [200] Abgesehen von diesen für PEI typischen Elementen wurden keine nennenswerten Signale detektiert, welche auf eine organische oder anderweitig geartete Kontamination hindeuteten. Lediglich eine geringe, möglicherweise aus der Herstellung stammende, Menge an Silizium wurde auf der PEI Oberfläche nachgewiesen. (Abbildung 18 & Tabelle 6)



**Abbildung 18. Atomare Oberflächenszusammensetzung der PEI-Filme.** Repräsentatives Übersichts- und C 1s Regionalspektrum der mittels XPS analysierten PEI-Film Oberfläche.

Anhand der Regionalspektren des C1s-Signals konnten weitere Rückschlüsse hinsichtlich des Vorhandenseins funktioneller Gruppen an der PEI-Oberfläche gezogen werden. Diese wurde vornehmlich durch ein starkes Signal bei 285 eV für die C-C bzw. C=C - Bindungen der aromatischen und aliphatischen Gruppen geprägt. (Tabelle 5B) Zusätzlich zeigten sich schwächere Signale für die Etherbrücken (C-O) bei 286,5 eV sowie die Phthalimid- bzw. Carbonylgruppen (C=O) bei 288,8 eV.

**Tabelle 6. Atomare Oberflächenszusammensetzung nativer PEI-Filme.** Mittels XPS ermittelte absolute Mengen sowie die Verhältnisse der Atome zueinander für PEI.

**(A) Übersichtsspektrum**

**Atomare Zusammensetzung [at-%]**

C	N	O	S	P	Si	N/C	O/C
83,3 ± 0,1	3,6 ± 0,1	12,8 ± 0,1	0	0	0,3 ± 0,1	0,043 ± 0,001	0,154 ± 0,002

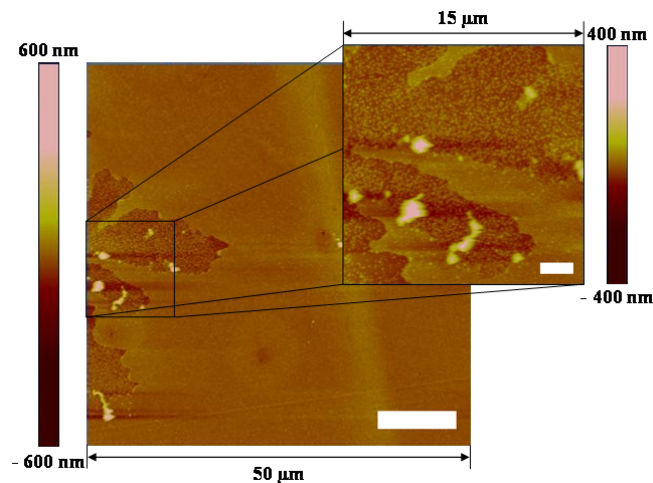
**(B) C1s-Regionalspektrum**

chemische Bindung	Bindungsenergie [eV]	Anteil [%]
C-C, C=C	285,0	75,7 ± 2,0
C-O	286,5	14,9 ± 1,2
C=O	288,8	9,4 ± 0,9

Die taktile Abtastung der nativen PEI-Film Oberfläche mit Scangrößen von bis zu 50  $\mu\text{m}$  Kantenlänge wies auf eine glatte und homogene Oberfläche mit einer durchschnittlichen Rauigkeit im Bereich von  $R_q \approx 4 \text{ nm}$  hin. (Tabelle 6) Hierbei waren mit steigender Größe der vermessenen Fläche keine signifikanten Änderungen der Topographie zu erkennen. Dennoch zeigten einige Messungen sporadisch auftretende sternförmige Kavitäten mit einer Ausdehnung von  $\sim 30 \mu\text{m}$ , jedoch nur einer Tiefe von wenigen nm. (Abbildung 19) Diese Strukturen führten zu einem Anstieg der Standardabweichung, wurden jedoch bewusst nicht diskriminiert, da sie anders als eine Fehlstelle (Kratzer o.ä.) ein Strukturelement die PEI-Oberfläche darstellen.

**Tabelle 7.** Topographie nativer PEI-Filme in Wasser bestimmt mit AFM.

mittlere Rauigkeit [nm]	Scan Kantenlänge [ $\mu\text{m}$ ]		
	5	15	50
$R_a$	$2,0 \pm 2,0$	$2,7 \pm 3,0$	$2,9 \pm 3,0$
$R_q$	$2,8 \pm 2,5$	$3,9 \pm 4,4$	$4,4 \pm 4,7$



**Abbildung 19. Oberflächenstrukturen auf PEI-Filmen.** Einige AFM Scans zeigten wenige Nanometer tiefe, unregelmäßig verteilte, sternförmige Kavitäten an der PEI Oberfläche (AFM Höhenscans; Maßstab: 50  $\mu\text{m}$  Scan = 10  $\mu\text{m}$ ; 15  $\mu\text{m}$  Scan = 2  $\mu\text{m}$ )

## 6.2. Grenzflächencharakterisierung nativer PEI-Filme auf mikro- und makroskopischer Ebene

Um eine detaillierte Beschreibung des vorliegenden polymeren Systems an seiner Grenzfläche zu erhalten, wurden ebenso Charakterisierungsmethoden angewandt, welche eine Aussage über mikro- und makroskopische Grenzflächeneigenschaften erlauben. Hierzu zählten die Bestimmung des Benetzungsverhaltens und der Oberflächenenergie mittels Tropfenkonturanalyse, die Topographie im mm-Bereich durch optische Profilometrie sowie die Ermittlung des Grenzflächenpotenzials.

Die Bestimmung des Benetzungsverhaltens ergab für die nativen PEI-Filme einen voranschreitenden Kontaktwinkel von  $\Theta_{adv} = 87,2^\circ \pm 1,4^\circ$  und  $\Theta_{rec} = 70,5^\circ \pm 2,6^\circ$  für den Zurückziehenden, was

in einer Hysterese von  $16,7 \pm 2,3^\circ$  resultierte. (Tabelle 8) Dieses Ergebnis wies in Übereinstimmung mit früheren Analysen auf eine hydrophobe und homogene Oberfläche hin. [42] Die aus den zurückziehenden Kontaktwinkeln zweier Messungen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen berechnete Oberflächenenergie  $\gamma$  der nativen Polymerfilme zeigte, dass etwa ein Viertel der Kräfte über polare Interaktionen vermittelt wird. Das Verhältnis zwischen polaren und dispersen Komponenten war anhand der multiplen partiell negativ geladenen Carbonylgruppen auf der ansonsten durch hydrophobe aromatische Systeme dominierten PEI Oberfläche zu erwarten. Die ermittelte Gesamtenergie entsprach den Angaben des Herstellers, welcher die Oberflächenenergie von PEI mit 35 - 40 mN/m angibt. [201]

**Tabelle 8.** Ergebnisse der Strömungspotenzial und Kontaktwinkelmessungen sowie der daraus kalkulierten Oberflächenenergie nativer PEI-Filme

	Kontaktwinkel [°]		Oberflächenenergie [mN/m]			Strömungspotential	
	Wasser-Luft	Hexadecan-Wasser	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma$	$\zeta$ at pH=7,4 [mV]	IEP ( $\zeta = 0$ ) [pH]
$\Theta_{adv}$	$87,2 \pm 1,4$	$142,4 \pm 6,0$	$0,6 \pm 0,2$	$49,4 \pm 4,3$	$50,0 \pm 4,1$	-95	2.9
$\Theta_{rec}$	$70,5 \pm 2,6$	$99,6 \pm 7,3$	$9,2 \pm 3,2$	$34,2 \pm 14,0$	$43,4 \pm 10,8$		
<b>Hyst</b>	$16,7 \pm 2,3$	$42,8 \pm 7,3$					

Während der Messung des Zeta-Potenzials  $\zeta_U$  als Funktion der pH-Wert Änderung im Bereich von pH 3 bis 9 wurde für den nativen PEI-Film ein isoelektrischer Punkt (IEP) von 2,9 beobachtet. Für alle pH-Werte verringerte sich  $\zeta_U$  annähernd sofort. Es gab kein Anzeichen eines Plateaus für  $\zeta_p = \text{konstant}$ . Während des nachfolgenden Anstieges des pH bis auf 9 stieg  $\zeta_U$  einheitlich und konstant an, wobei der IEP bei pH 2,9 bestätigt wurde. Bei pH 7,4 lag  $\zeta_U$  bei -95 mV.

**Tabelle 9.** Topographie nativer PEI-Filme bestimmt mit optischer Profilometrie.

mittlere Rauigkeit [ $\mu\text{m}$ ]	Scanfläche	
	(50 x 50) $\mu\text{m}^2$	(4 x 0,25) $\text{mm}^2$
$R_a$	$2,93 \pm 0,80$	$6,28 \pm 1,79$
$R_q$	$5,72 \pm 0,66$	$9,14 \pm 1,69$

Die Resultate der optischen Profilometrie zeigten bei einer mit der zuvor beschriebenen taktilen Methode vergleichbaren Messfläche von 50  $\mu\text{m}$  Kantenlänge eine um den Faktor  $10^3$  größere Rauigkeit. Diese Diskrepanz zwischen den beiden Charakterisierungsmethoden trat nur bei PEI-Filmen auf und war bei der Charakterisierung der anderen Materialien nicht erkennbar. (vgl. Anhang 10.2.) Da es sich bei der Profilometrie um ein optisches Verfahren mit Wellenlängen im sichtbaren Spektrum handelt und PEI aufgrund seines aromatischen Charakters über eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz verfügt, haben die optischen Eigenschaften des Polymers möglicherweise zu bereits unter 4.3.2. beschriebenen Messfehlern geführt. Aufgrund der hohen Rauigkeits-

unterschiede bei einem vergleichbaren Messareal sind auch die profilometrischen Ergebnisse größerer Messareale wenig aussagekräftig. Die Resultate der Rasterkraftmikroskopie hingegen ergaben ein detailliertes Bild der PEI Topographie und stimmten mit früheren Studien überein.

### 6.3. Biologische Evaluierung und Endothelialisierungspotenzial der PEI-Filme

#### 6.3.1. Indirekte Untersuchung der Zytotoxizität von PEI-Filmen mit L929-Fibroblasten

Die Morphologie der L929 Zellen war 48 h nach der Aussaat auf TCP im PEI-Extrakt geringfügig gegenüber den Kontrollzellen in reinem Zellkulturmedium verändert. Sie wiesen eine weniger stark ausgeprägte Spindelform auf. Ebenso zeigten sie eine höhere Zelldichte und ein vermehrtes Auftreten morphologisch größerer Unterstützerzellen. (Abbildung 20)

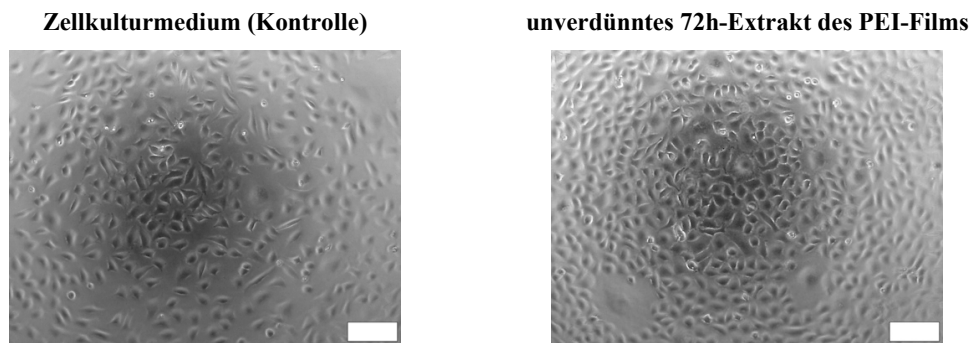


Abbildung 20. L929-Fibroblasten 48 h nach Aussaat auf TCP in Zellkulturmedium sowie einem unverdünnten 72h-Extrakt des PEI-Films. Dokumentation mittels Phasenkontrastmikroskopie in Transmission bei 10-facher Primärvergrößerung. (Maßstab: 100 µm)

Die Freisetzung intrazellulärer Laktatdehydrogenase (LDH) aus membrangeschädigten Zellen in den Überstand zeigte im quantitativen Nachweis keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle mit einer Absorption von  $0,87 \pm 0,01$  Absorptionseinheiten (AU) und  $0,84 \pm 0,12$  AU ( $p = 0,5524$ ) für das unverdünnte bzw.  $0,79 \pm 0,17$  AU ( $p = 0,2651$ ) für das 10-fach verdünnte PEI-Extrakt. (Abbildung 21)

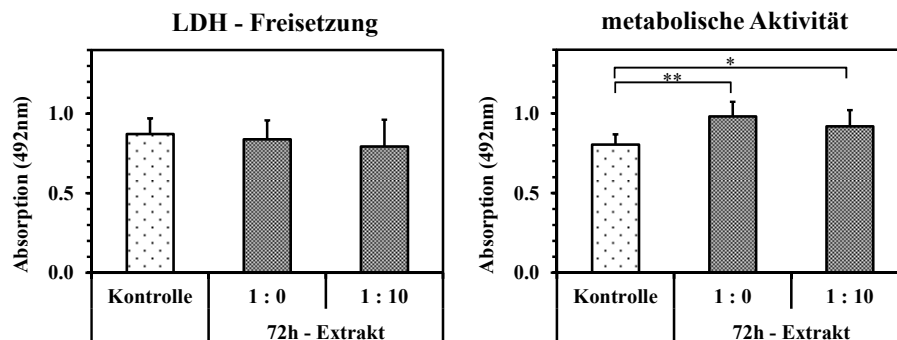


Abbildung 21. LDH Aktivität im extrazellulären Medium (links) und metabolische Aktivität der L929-Fibroblasten (rechts) 48 h nach Aussaat in purem Zellkulturmedium (Kontrolle) und 72h-Extrakt des PEI-Films. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 8$ )

Im MTS Assay war für die PEI-Extrakte eine signifikant erhöhte metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die Absorptionsmessung ergab beim unverdünnten Extrakt  $0,98 \pm 0,09$  AU ( $p = 0,0023$ ) sowie beim verdünnten  $0,92 \pm 0,10$  AU ( $p = 0,0471$ ) und war damit im Vergleich zur Kontrolle mit  $0,80 \pm 0,07$  AU signifikant erhöht. Dieses Ergebnis wies auf einen milden und konzentrationsabhängigen Effekt des PEI-Extraktes auf die L929 Zellen hin. Der mittels LAL-Test untersuchte Endotoxingehalt auf PEI war mit  $0,077 \pm 0,001$  EU/ml deutlich unterhalb des von der FDA festgelegten Grenzwertes von 0,5 EU/ml für Biomaterialien. [26]

### 6.3.2. Direkte zytotoxische Untersuchung mit primären HUVEC

Die visuelle Evaluierung des Wachstums von HUVEC auf PEI zeigte keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wachstum auf TCP als Referenz. Die Endothelzellen adhärten und zeigten morphologisch eine typische polyklonale Form. Der einzige sichtbare Unterschied zur Kontrolle war eine verringerte Zelldichte auf den PEI-Filmen. (Abbildung 22)

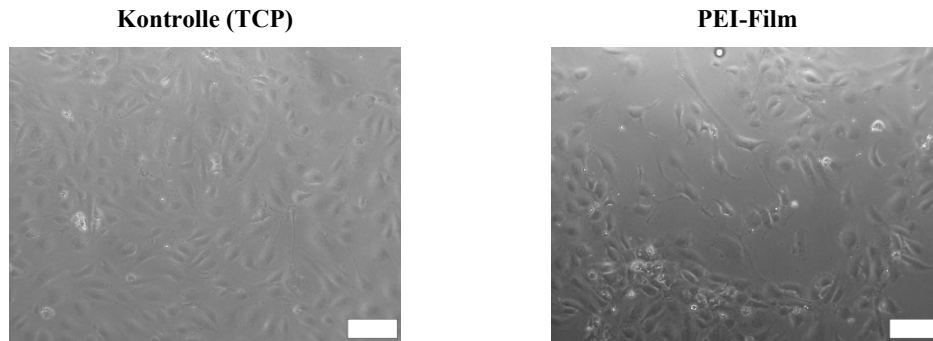


Abbildung 22. Primäre HUVEC 48 h nach der Aussaat auf glatten PEI-Filmen (rechts) und TCP als Wachstumskontrolle (links). Dokumentation mittels Phasenkontrastmikroskopie in Transmission bei 10-facher Primärvergrößerung. (Maßstab: 100  $\mu$ m)

Hinsichtlich der extrazellulären LDH-Aktivität war kein signifikanter Unterschied zwischen TCP ( $0,10 \pm 0,02$  AU) und PEI ( $0,11 \pm 0,02$ ;  $p = 0,2041$ ;  $n = 8$ ) detektierbar. (Abbildung 23) Dennoch war die metabolische Aktivität der Endothelzellen auf PEI ( $0,40 \pm 0,06$  AU) im Vergleich zur Kontrolle ( $0,54 \pm 0,04$  AU;  $p = 0,0002$ ;  $n = 8$ ) signifikant verringert.

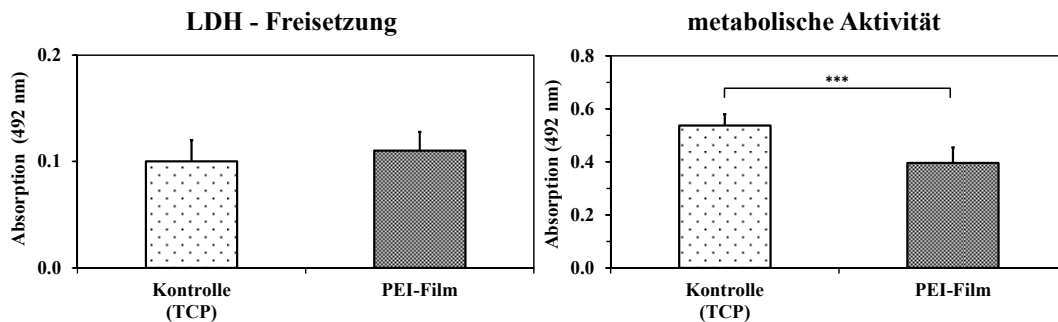
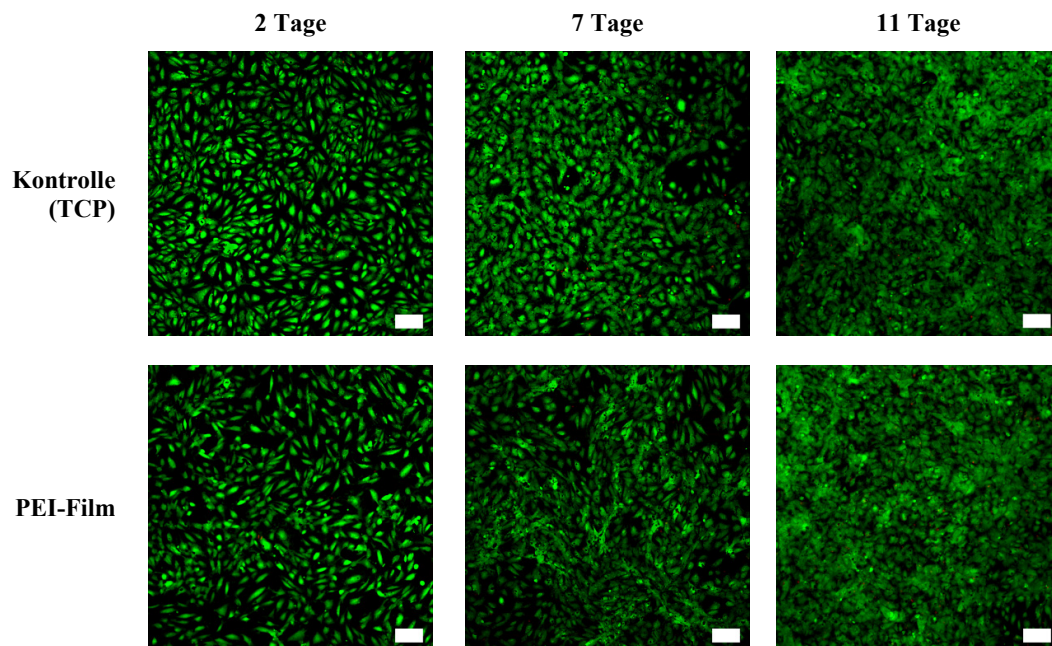


Abbildung 23. LDH Aktivität im Zellkulturüberstand (links) und metabolische Aktivität der HUVEC (rechts) 48 h nach Aussaat auf glatten PEI-Filmen sowie TCP als Wachstumskontrolle. (Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*\*\*  $p < 0,0005$ ;  $n = 8$ )

6.3.3. Statisches *in vitro* Endothelialisierungsmodell

*Bestimmung der Zellvitalität auf PEI-Filmen*

Die Versuche über elf Tage zeigten, dass HUVEC auf PEI-Filmen adhärirten und über die Zeit einen konfluenten Monolayer ausbildeten. Bereits sieben Tage nach der Aussaat waren sowohl auf PEI, als auch auf der Kontrolle keine Lücken mehr im Zellrasen erkennbar. Immunfluoreszenzfärbung und Zählung vitaler als auch toter adhärenter Endothelzellen ergaben eine initial geringere Zelldichte vitaler HUVEC auf PEI zwei Tage nach der Aussaat im Vergleich zur Kontrolle (TCP  $45.667 \pm 8.106$  Zellen/cm<sup>2</sup> und PEI  $32.116 \pm 6.909$  Zellen/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,0012$ ;  $n = 8$ ). (Abbildung 24 & 25) Nach sieben Tagen zeigte der Zelllayer auf PEI eine mit der Kontrolle vergleichbare Zelldichte, welche bis zum Ende des Experimentes konstant blieb. Allerdings unterschied sich die Anzahl toter adhärenter Zellen zwischen TCP und PEI sowohl nach sieben Tagen (TCP  $10.396 \pm 2.421$  Zellen/cm<sup>2</sup> und PEI  $7.769 \pm 1.845$  Zellen/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,0263$ ;  $n = 8$ ) als auch nach elf Tagen (TCP  $6.245 \pm 2.195$  Zellen/cm<sup>2</sup> und PEI  $13.200 \pm 5.410$  Zellen/cm<sup>2</sup>;  $p = 0,0030$ ,  $n = 8$ ) signifikant.



**Abbildung 24. Vitalität und Ausbildung des HUVEC-Layers zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat.** Initial wurden  $3 \cdot 10^4$  Zellen auf PEI-Filmen (15 mm Stanzlinge) sowie TCP als Wachstumskontrolle ausgesät. Lebende Zellen wurden mittels Fluoresceindiacetat (FDA, grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (PI, rot) gefärbt. (Bildokumentation mittels cLSM bei 10-facher Primärvergrößerung; Maßstab: 100  $\mu$ m)

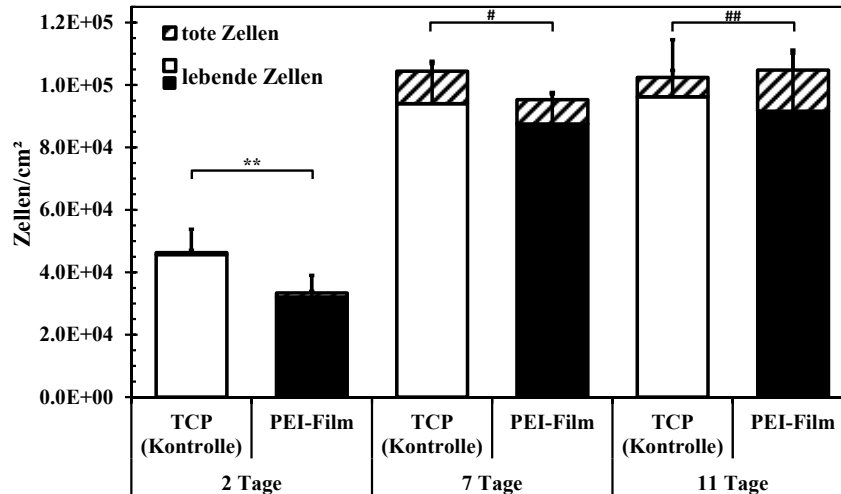
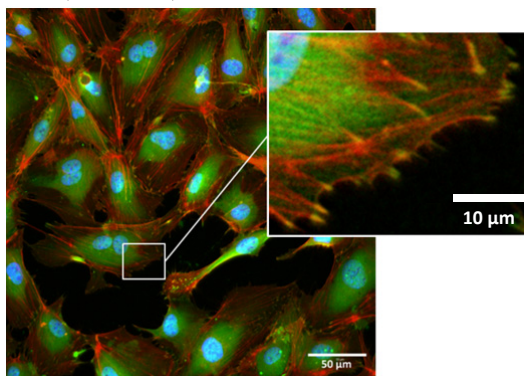


Abbildung 25. Zelldichte von HUVEC nach Aussaat auf PEI und TCP als Kontrolle für einen Zeitraum von maximal elf Tagen. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* Signifikanz lebender Zellen; # Signifikanz toter Zellen; # p < 0,05; \*\*## p < 0,005; n = 8)

#### Beurteilung der Zell-Matrix Interaktion

Das Zytoskelett sowie die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung der Aktinfilamente und des Proteins Vinkulin, welches Bestandteil fokaler Adhäsionskomplexe ist, zwei Tage nach der Aussaat auf PEI-Filmen untersucht. (Abbildung 26) Zusätzlich wurden die Zellkerne der HUVEC mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) hervorgehoben.

#### Glas (Kontrolle)



#### PEI - Film

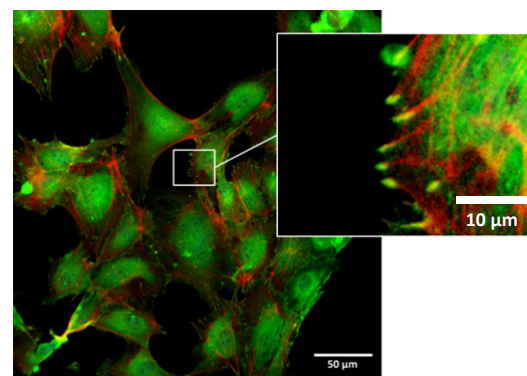


Abbildung 26. Fluoreszenzfärbung des Aktin Zytoskeletts (rot), des fokalen Adhäsionsproteins Vinkulin (grün) sowie der genomischen DNS (blau) von HUVEC 48 h nach der Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle. (Bildokumentation mittels cLSM bei 40-facher Primärvergrößerung)

HUVEC zeigten auf PEI ein mit der Kontrolle (Glas) vergleichbares netzartiges Wachstumsmuster, welches für einen subkonfluenten Zellmonolayer in diesem Stadium typisch ist. Es waren deutlich zentral im Zellkörper lokalisierte Aktin Stressfasern zu erkennen, welche üblicherweise während des Adhäsionsprozesses verstärkt ausgebildet werden. Die Termini dieser Zytoskelett-



fasern waren in den meisten Fällen mit Vinkulin co-lokalisiert. Diese Komplexe vermitteln zu einem großen Teil die initiale Interaktion der Zelle mit dem Substrat. Die Färbung der genomischen DNS mittels DAPI war auf den PEI-Filmen nur bei höheren Primärvergrößerungen sichtbar, was auf die starke Hintergrundfluoreszenz dieses aromatischen Polymers zurückzuführen ist.

### ***Sekretionsprofil vasoaktiver und inflammatorischer Mediatoren***

Zur Beurteilung der Funktionalität des Endothelzelllayers auf PEI-Filmen wurden die Konzentrationen vasoaktiver Mediatoren wie Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und seines physiologischen Antagonisten Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sowie prominente inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren mittels eines kompetitiven ELISA Assays aus dem Überstand quantifiziert. (Abbildung 27)

Die PGI<sub>2</sub> Sekretion war sieben Tage nach der Aussaat auf PEI ( $91,5 \pm 8,2$  pg/ml) signifikant niedriger als auf TCP ( $100,8 \pm 2,9$  pg/ml;  $p = 0,021$ ;  $n = 6$ ). Die sekretierte Menge an TXA<sub>2</sub> bewegte sich hingegen während der gesamten Dauer des Experimentes an der unteren Nachweisgrenze und zeigte keine Unterschiede zwischen PEI und TCP (für PEI  $1,1 \pm 0,6$  pg/ml und TCP  $1,4 \pm 1,2$  pg/ml nach zwei Tagen bis auf  $7,3 \pm 1,3$  pg/ml für PEI und  $4,8 \pm 1,7$  pg/ml für TCP nach elf Tagen).

Bei der Analyse inflammatorisch wirkender Mediatoren sowie verschiedener Wachstumsfaktoren wurden nur für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und -8 Material abhängige Unterschiede detektiert. Die aus dem Überstand nachgewiesenen Konzentrationen beider Zytokine bewegten sich während des gesamten Experimentes im pg-Bereich, wohingegen die IL-1 $\beta$  aktivierten Zellen der Positivkontrolle stets im ng-Bereich angesiedelt waren. (bei IL-6 zwischen 35 - 40 ng/ml und bei IL-8 zwischen 40 - 60 ng/ml jeweils für PEI und TCP) Die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 war im Vergleich zur TCP Kontrolle auf PEI stets signifikant verringert. (nach zwei Tagen: PEI  $40,9 \pm 12,2$  pg/ml; TCP  $62,4 \pm 9,2$  pg/ml;  $p = 0,0002$ ;  $n = 6$ ) Im Laufe der Zeit stiegen die nachgewiesenen IL-6 Konzentrationen bis zum siebten Tag nach der Aussaat an und veränderten sich nachfolgend bis zum Ende des Experimentes nicht weiter. (nach sieben Tagen: PEI  $91,3 \pm 13,5$  pg/ml; TCP  $127,8 \pm 33,2$  pg/ml;  $p = 0,0322$  und nach elf Tagen: PEI  $94,7 \pm 12,5$  pg/ml; TCP  $128,8 \pm 13,4$  pg/ml;  $p = 0,0011$ ; jeweils  $n = 6$ )

Die Konzentration von IL-8 war im Vergleich zum IL-6 stets höher (im ng-Bereich). Während des Experimentes war ein zeitabhängiger Anstieg der IL-8 Mengen im Überstand sowohl auf PEI als auch der Kontrolle zu erkennen. Im direkten Vergleich zeigte sich eine signifikant verringerte Sekretion auf PEI zwei Tage nach der Aussaat. (TCP  $615,5 \pm 313,6$  pg/ml und PEI  $445,5 \pm 226,8$  pg/ml;  $p = 0,0106$ ;  $n = 6$ ) Nach sieben Tagen zeigte sich das umgekehrte Bild mit einer signifikant erhöhten IL-8 Konzentration auf PEI. (TCP  $1.109,9 \pm 198,3$  pg/ml und PEI  $1.377,6 \pm 372,4$  pg/ml;  $p = 0,0021$ ;  $n = 6$ ) Elf Tage nach der Aussaat waren keine Unterschiede der IL-8 Konzentrationen mehr detektierbar.

## VI. ERGEBNISSE

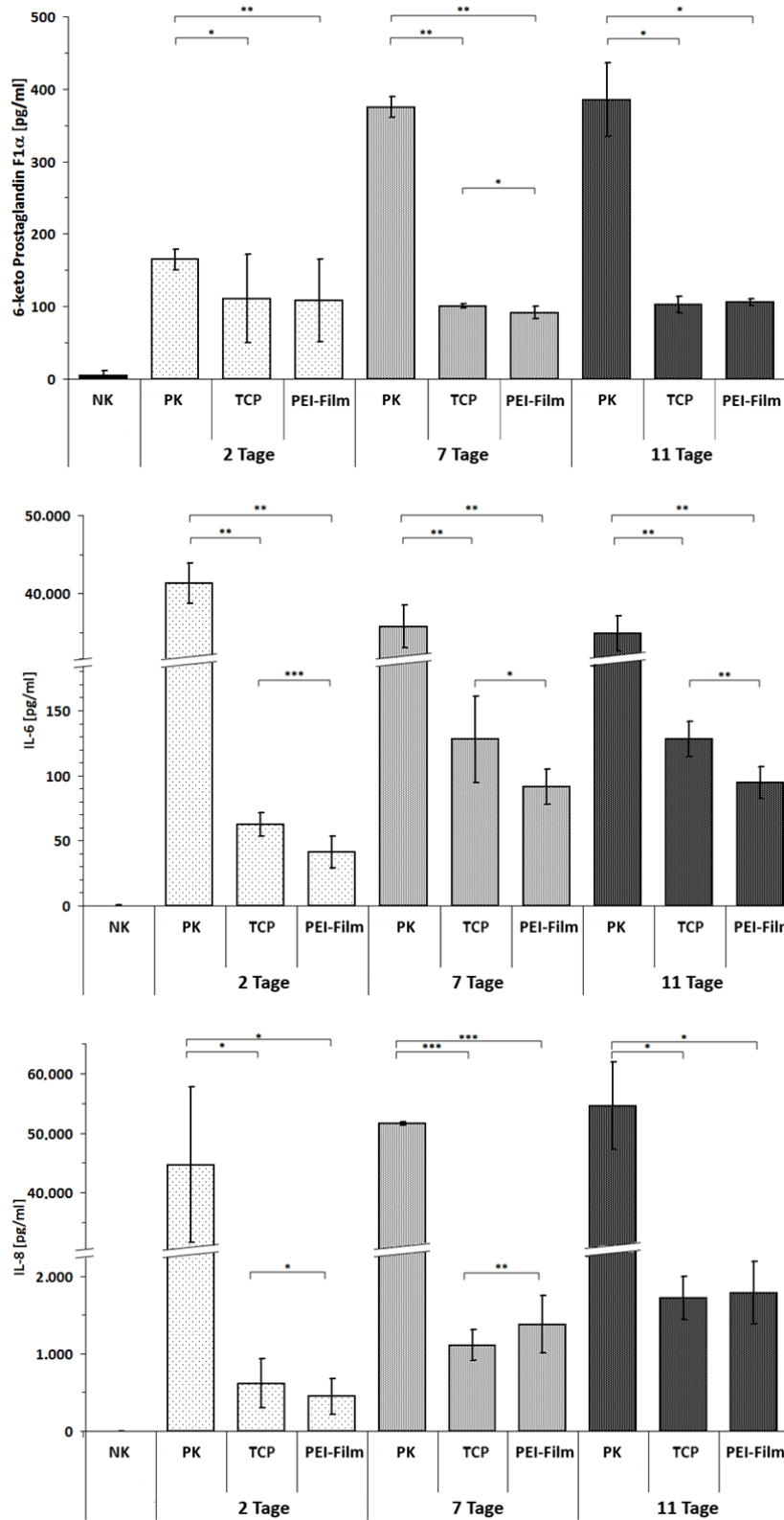
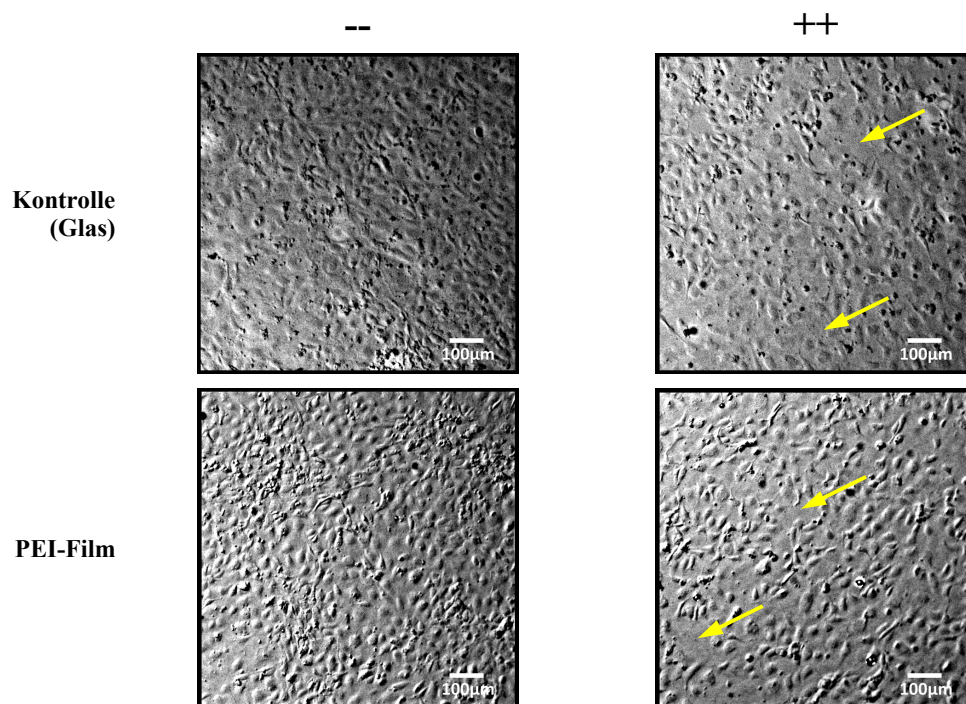


Abbildung 27. Vasoaktive und pro-inflammatorische Mediatoren wurden bis zu elf Tage nach der Aussaat von HUVEC auf PEI-Filmen und TCP als Kontrolle mittels ELISA im Überstand quantifiziert. (Arithmetrischer Mittelwert ± Standardabweichung; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ;  $n = 6$ ; NK: Negativkontrolle (EGM-2); PK: Positivkontrolle (IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml))

6.3.4. Dynamisches *in vitro* Endothelialisierungsmodell*Scherresistenz und Morphologie des HUVEC Monolayers auf PEI-Filmen*

Die Experimente zeigten, dass HUVEC unter statischen Wachstumsbedingungen in der Lage waren, einen funktionell konfluenten Monolayer auf PEI-Filmen auszubilden. In dieser Studie wurde untersucht, ob der Zellschicht unter physiologischem Scherstress stabil war. Die Ergebnisse des dynamischen *in vitro* Modells offenbarten, dass unter laminaren Scherstress der HUVEC Monolayer auf PEI partiell beschädigt wurde, was sich im Auftreten kleinerer zellfreier Areale (Pfeile im Bild) im HUVEC-Layer äußerte. (Abbildung 28) Anhand der Zelldichte war zu erkennen, dass die initiale Zellzahl/cm<sup>2</sup> vor dem Anlegen der Scherkräfte auf PEI stets geringer war als auf der Kontrolle, signifikant jedoch nur nach 48 h. (Abbildung 29; nach 8 h: PEI 11.939 ± 2.548 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 20.283 ± 7.844 Zellen/cm<sup>2</sup>, nach 48 h: PEI 26.206 ± 2.737 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 42.933 ± 4.051 Zellen/cm<sup>2</sup> ( $p = 9,98 \cdot 10^{-6}$ ) und nach neun Tagen: PEI 64.056 ± 2.829 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 71.656 ± 8.830 Zellen/cm<sup>2</sup>) Nach Anlegen von 3 dyn/cm<sup>2</sup> für sechs Stunden war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der verbliebenen Zelldichte auf PEI und der Kontrolle zu erkennen. (nach 8 h: PEI 7.706 ± 1.377 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 9.667 ± 1.461 Zellen/cm<sup>2</sup>, nach 48 h: PEI 17.856 ± 3.609 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 20.739 ± 2.579 Zellen/cm<sup>2</sup> und nach neun Tagen: PEI 45.422 ± 2.507 Zellen/cm<sup>2</sup>; Glas 42.239 ± 5.607 Zellen/cm<sup>2</sup> jeweils nach der Scherung) Die angelegte laminare Strömung führte sowohl auf den PEI-Filmen als auch auf Glas zu einem Zellverlust. Dieser war jedoch auf PEI prozentual betrachtet signifikant geringer (Abbildung 30; Zellverlust nach 8 h: PEI 33,7 ± 13,5%; Glas 44,1 ± 25,9% ( $p = \text{n.s.}$ ); nach 48 h: PEI 31,5 ± 14,3%; Glas 50,9 ± 11,1% ( $p = 0,010$ ) und nach neun Tagen: PEI 29,1 ± 2,9%; Glas 41,1 ± 2,4% ( $p = 0,0014$ )).



**Abbildung 28.** HUVEC-Monolayer Formierung neun Tage nach der Aussaat auf PEI-Filmen sowie Glas als Kontrolle jeweils vor und nach Exposition von venösem Scherstress. [--] vor der Scherung; [++] nach der Scherung; 6 h bei 3 dyn/cm<sup>2</sup>; Maßstab: 100 µm)

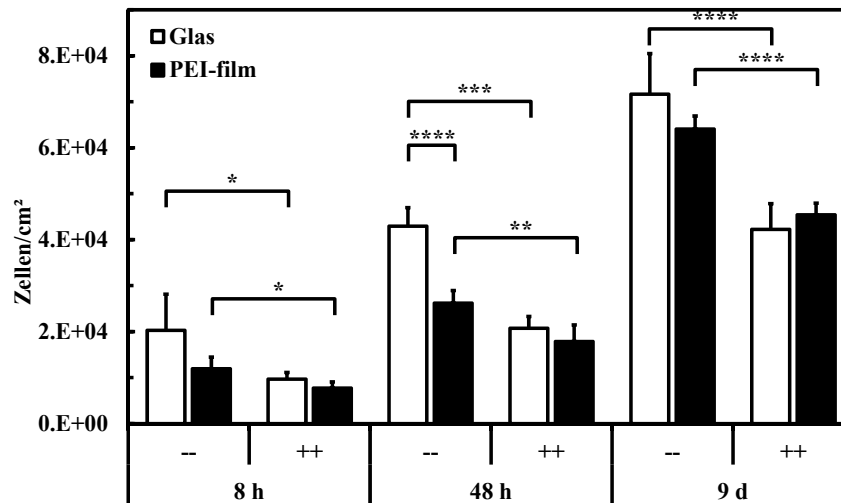


Abbildung 29. HUVEC Zelldichte nach maximal neuntägiger Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle vor und nach der Exposition venösen Scherstress. ([-] vor der Scherung; [+] nach der Scherung; Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $n = 6$ )

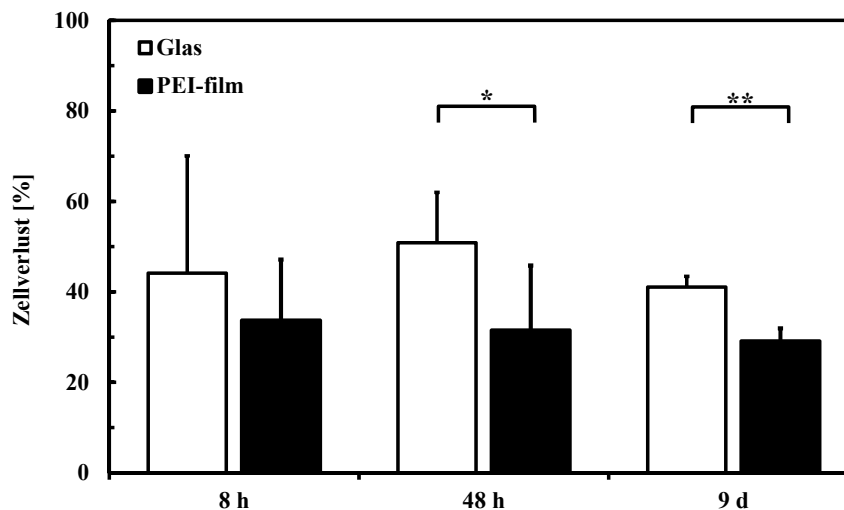
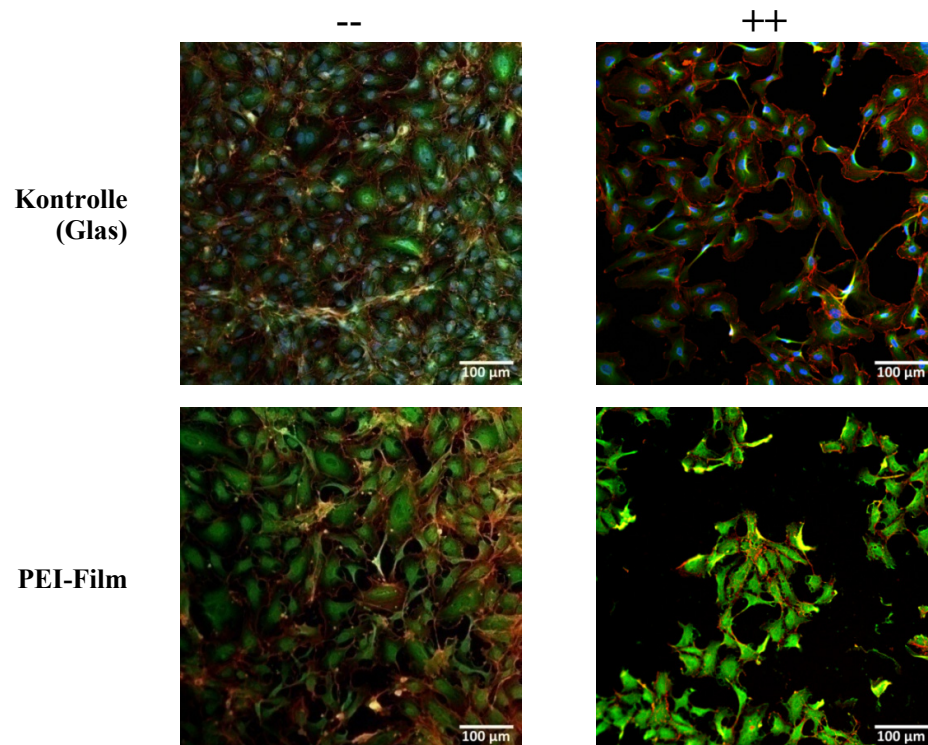


Abbildung 30. Prozentuale Darstellung des Zellverlustes nach der Exposition physiologischen Scherstress. Nachweis eines geringeren Zellverlustes auf PEI während der Scherung des Endothelzelllayers für 6 Stunden bei 3 dyn/cm<sup>2</sup>. (Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ;  $n = 6$ )

### Re-Organisation des Aktin Zytoskeletts und Verstärkung der fokalen Adhäsionen

Nach der Behandlung des HUVEC Monolayers mit venösem Scherstress konnten zwischen den auf PEI und auf Glas verbliebenen Zellen keine sichtbaren Unterschiede hinsichtlich der Ausbildung des Zytoskeletts sowie der fokalen Adhäsionskomplexe ermittelt werden. (Abbildung 31) Auf beiden Materialien waren ein durch die Scherung hervorgerufener Zellverlust und die damit

verbundene Entstehung zellfreier Areale erkennbar. Die Morphologie der Zellen in Hinsicht auf die Organisation des Aktin Zytoskeletts sowie die Ausprägung der fokalen Adhäsionskomplexe blieb unverändert.

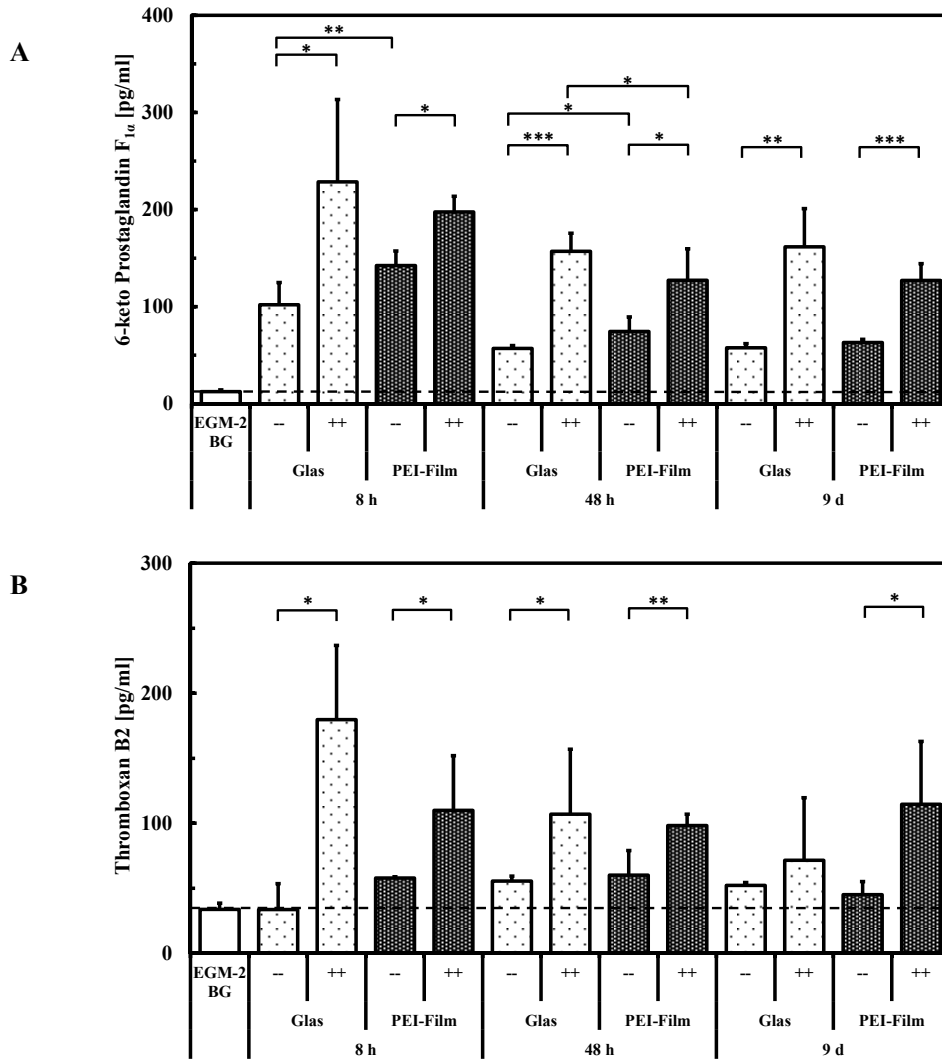


**Abbildung 31. HUVEC Zytoskelett und fokale Adhäsionen neun Tage nach der Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle jeweils vor und nach der Scherung.** F-Aktin Zytoskelett (rot), Vinkulin (grün) und genomische DNS (blau) wurden Fluoreszenz gefärbt und die Bilder mittels cLSM bei 20-facher Primärvergrößerung dokumentiert. [--] vor der Scherung; [++] nach der Scherung; Maßstab: 100 µm)

### *Analyse des Sekretionsprofils vasoaktiver und inflammatorischer Mediatoren*

Wie bei den Versuchen im statischen Modell wurden auch hier die Konzentrationen vasoaktiver Mediatoren wie PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> sowie der pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-6 und -8 aus dem Überstand jeweils vor und nach der Scherung ermittelt. (Abbildungen 32 und 33)

PGI<sub>2</sub> war auf beiden Substraten im Überstand vor der Scherung initial im Bereich von 100 - 150 pg/ml erhöht, verringerte sich nach 48 h auf etwa 50 pg/ml und blieb dann bis zum Ende des Experimentes konstant. Hierbei war die Sekretion auf PEI-Filmen über die ersten zwei Tage im Vergleich zur Referenz signifikant erhöht. Nach der Scherung war die im Überstand detektierte PGI<sub>2</sub> Konzentration unabhängig vom unterliegenden Substrat oder der Wachstumszeit des Zelllayers signifikant erhöht. Hierbei war die PGI<sub>2</sub> Menge auf PEI immer tendenziell geringer als auf der Referenz. Hinsichtlich der nachgewiesenen TXA<sub>2</sub> Konzentrationen war bei den ungescherten Zellen nahezu keine nachweisbare Sekretion im Überstand beider Materialien zu detektieren. Durch das Anlegen venöser Scherkräfte erhöhte sich die Sekretion von TXA<sub>2</sub> stets signifikant bei den HUVEC um etwa das 5-fache, wobei kein Unterschied zwischen PEI und der Referenz nachgewiesen werden konnte.

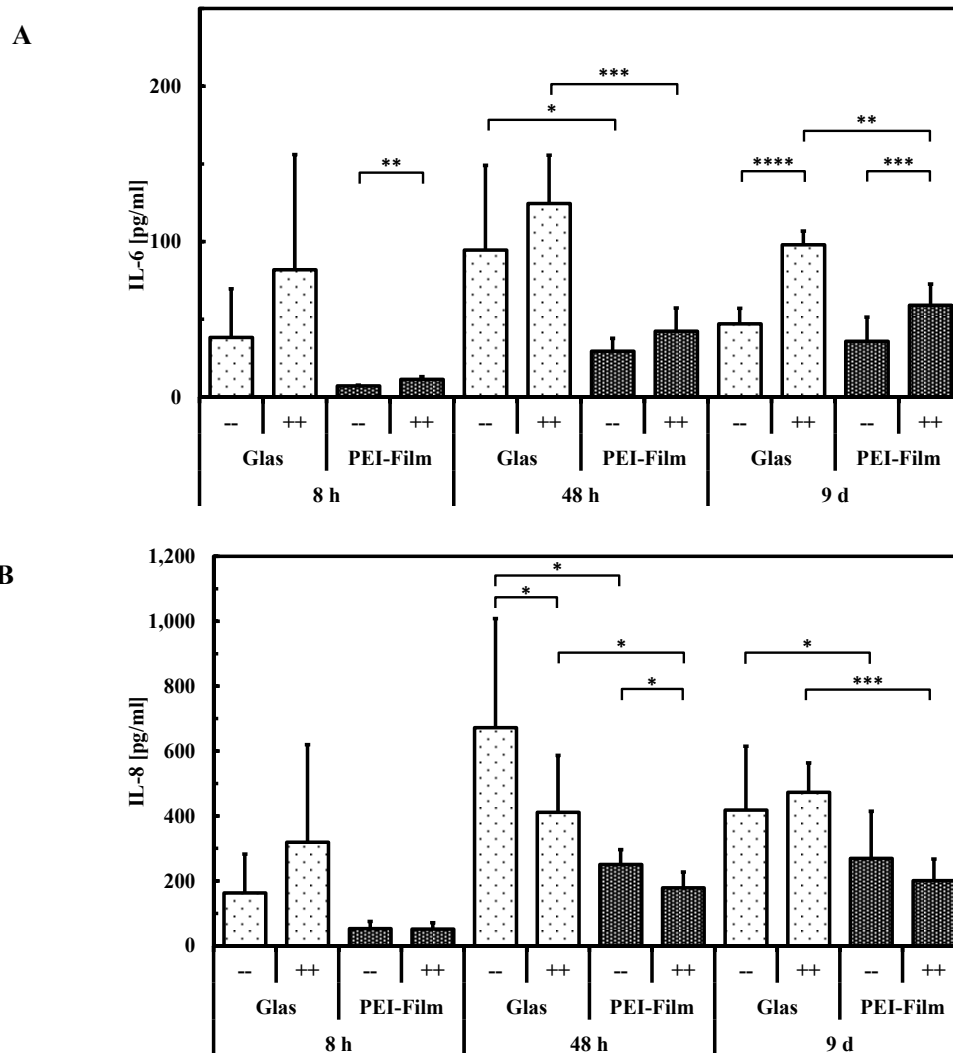


**Abbildung 32. Vasoaktives Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) (A) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (B) wurden vor [-] und nach [++] der Scherung mittels ELISA aus dem Überstand quantifiziert. HUVEC wurden zuvor unter statischen Bedingungen für bis zu neun Tage auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle kultiviert. (Arithmetrischer Mittelwert ± Standardabweichung; \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005; n = 6; EGM-2 BG: reines Zellkulturmedium als Hintergrundkontrolle)**

Zusätzlich zu vasoaktiven wurden ebenfalls die Sekretionsprofile pro- und anti-inflammatorisch wirkender Mediatoren sowie verschiedener Wachstumsfaktoren untersucht. Hierbei wurden erneut einzig für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und -8 vom Material sowie von den Scherkräften abhängige Unterschiede beobachtet. Die aus dem Überstand nachgewiesenen Konzentrationen beider Zytokine bewegten sich während des gesamten Experimentes im pg-Bereich, wohingegen die IL-1 $\beta$  aktivierten Zellen der Positivkontrolle stets im ng-Bereich angesiedelt waren (bei IL-6 zwischen 3 - 60 ng/ml und bei IL-8 zwischen 5 - 30 ng/ml jeweils für PEI und Glas).

Unter statischen Bedingungen war die Sekretion von IL-6 auf PEI tendenziell geringer als auf dem Referenzmaterial und nach 48 h signifikant. (PEI: 29,6 ± 8,2 pg/ml; Glas: 94,6 ± 54,4 pg/ml; p = 0,03957; n = 6) Das Anlegen von venösen Scherkräften induzierte bei den HUVEC, unab-

hängig vom unterliegenden Substrat, einen Anstieg der IL-6 Sekretion, welcher neun Tage nach der Aussaat für beide Materialien signifikant wurde. (PEI vor:  $35,9 \pm 15,5$  pg/ml und nach Scherung:  $59,1 \pm 13,6$  pg/ml ( $p = 0,00034$ ); Glas vor:  $47,2 \pm 9,9$  pg/ml und nach Scherung:  $98,0 \pm 8,8$  pg/ml ( $p = 0,00002$ ); jeweils  $n = 6$ ) Genau wie unter statischen zeigte sich auch unter dynamischen Bedingungen eine zum Referenzmaterial verringerte IL-6 Sekretion auf den PEI-Filmen nach der Scherung. Diese wurde 48 h und neun Tage nach der Aussaat signifikant. (nach 48 h und Scherung: PEI  $42,5 \pm 14,8$  pg/ml und Glas  $124,5 \pm 31,1$  pg/ml ( $p = 0,00021$ ); nach 9 Tagen und Scherung: PEI  $59,1 \pm 13,6$  pg/ml und Glas  $98,0 \pm 8,8$  pg/ml ( $p = 0,00098$ ); jeweils  $n = 6$ )



**Abbildung 33. Sekretionsprofile pro-inflammatorischer Zytokine Interleukin-6 (IL-6) (A) und Interleukin-8 (IL-8) (B) quantifiziert aus Überständen mittels ELISA vor [--] und nach [++] dem Anlegen von Scherkräften. HUVEC wurden zuvor unter statischen Bedingungen für bis zu neun Tage auf PEI und Glas als Kontrolle kultiviert. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $n = 6$ )**

Hinsichtlich IL-8 war kein eindeutiger durch Scherkräfte induzierter Effekt nachzuweisen. Die Konzentrationen von IL-8 veränderten sich zwischen statischen und dynamischen Bedingungen

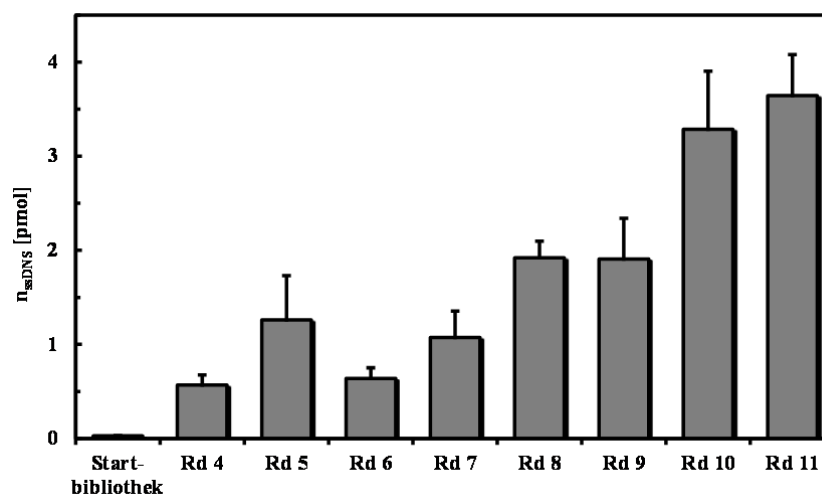
nur geringfügig. Unabhängig davon zeigte sich auf PEI eine marginal geringere Sekretion von IL-8 im Vergleich zum Referenzmaterial, welche nach 48 h und neun Tagen signifikant wurde. Dies war sowohl vor als auch nach der Scherung zu beobachten. (nach 48 h vor Scherung: PEI  $251,06 \pm 45,36$  pg/ml und Glas  $672,70 \pm 335,76$  pg/ml ( $p = 0,031$ ) und nach Scherung: PEI  $178,64 \pm 48,99$  pg/ml und Glas  $411,91 \pm 174,64$  pg/ml ( $p = 0,012$ ) sowie nach 9 Tagen vor Scherung: PEI  $269,57 \pm 145,04$  pg/ml und Glas  $418,54 \pm 196,56$  pg/ml ( $p = 0,0052$ ) und nach Scherung: PEI  $200,70 \pm 66,58$  pg/ml und Glas  $473,23 \pm 90,38$  pg/ml ( $p = 0,00011$ ); jeweils  $n = 6$ )

### 6.4. *In vitro* Selektion gegen die PEI-Film Oberfläche

Die Daten und Ergebnisse hinsichtlich der PCR-Optimierung zur Etablierung des SELEX Protokolls und der Auswahl eines geeigneten Kompetitors sind aufgrund ihres Umfangs und der geringeren Relevanz dem Anhang (vgl. 10.3./4.) zu entnehmen.

#### 6.4.1. Überwachung des Selektionsfortschrittes

Für die Überwachung des Selektionsfortschrittes während der *in vitro* Selektion und somit der schrittweisen Anreicherung bindender Aptamere in der Bibliothek wurde nach jeweils zwei Selektionsrunden die Bindung der Aptamere an die Polymeroberfläche mittels qPCR quantifiziert. Hierbei wurde stets das gleiche Verhältnis von angereicherter Bibliothek und verfügbarer Polymeroberfläche verwendet und die absolute Bindung mit den vorangegangenen Selektionsrunden als auch der Ausgangsbibliothek in Relation gesetzt. Insgesamt wurden im Rahmen der PEI-SELEX elf aufeinander folgende Selektionsrunden durchgeführt und die Bindung periodisch quantifiziert. (Abbildung 34) Mit dem Voranschreiten der SELEX war beginnend mit der Selektionsrunde vier bis zur Runde elf ein Anstieg der am Material bindenden Sequenzen zu verzeichnen. Die nachgewiesene Stoffmenge lag hierbei im Bereich von 4 pmol, was bei einer angenommenen Gleichverteilung mit einer Aptamerdichte von  $\sim 4 \cdot 10^4$  Aptameren pro  $\mu\text{m}^2$  korrespondiert.



**Abbildung 34. Ergebnisse der Überwachung des Selektionsfortschrittes mittels qPCR.** Quantitativer Nachweis der Anreicherung bindender Sequenzen über den Verlauf der *in vitro* Selektion bis zu Runde elf. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )



**6.4.2. Untersuchung der Aptamerbindung an PEI-Filme**

Zusätzlich zum quantitativen Nachweis einer gesteigerten Materialbindung angereicherter Aptamere aus Selektionsrunde elf wurde diese zur Validierung der Ergebnisse ebenfalls mit weiteren physikalischen und (bio)chemischen Methoden überprüft. Dies erfolgte sowohl mit Methoden, welche eine Aussage in der Größenordnung der Aptamere (atomare bzw. nm-Ebene) zulassen, als auch mit jenen für Schlussfolgerungen im mikro- und makroskopischen Bereich.

***Atomare bzw. molekulare Oberflächenzusammensetzung***

Sowohl die Behandlung der PEI-Filme mit Selektionspuffer als auch mit den angereicherten Aptameren zeigten keine Veränderungen in der mittels XPS und Raman Spektroskopie analysierten chemischen Oberflächenzusammensetzung. Die prozentualen Anteile von C, N und O blieben unverändert und es konnten keine Spuren von Phosphor als essentieller Bestandteil des DNS Rückgrats oder Schwefel detektiert werden. Letzterer wurde für einen eindeutigen Nachweis in Form einer 5'-Biotinylierung in die bindenden Aptamere eingefügt.

Ebenso waren im Rahmen weiterer Raman Experimente keine Veränderungen bzw. zusätzliche Signale für Molekülschwingungen erkennbar. Die aufgenommenen Spektren waren im Rahmen der normalen Schwankungen deckungsgleich. (vgl. Anhang 10.2.)

***Topographie auf Ebene der Aptamerbindung***

Untersuchungen der Nanorauigkeit nach der Aptamerbindung mit dem Rasterkraftmikroskop zeigten keine Veränderung der Topographie. Zwar war sowohl nach der Inkubation in Selektionspuffer als auch in Verbindung mit ssDNS eine tendenziell erhöhte Rauigkeit um den Faktor 2 ersichtlich, jedoch ließ die höhere Standardabweichung ebenso auf eine inhomogenere Oberfläche schließen. (Tabelle 10) Verantwortlich waren hierfür die bereits beschriebenen sporadisch auftretenden sternförmigen Oberflächenstrukturen. Aufgrund der hohen Standardabweichung können daher keine klaren Aussagen über eine Aptamer bedingte Veränderung der Topographie in Nanometerbereich getroffen werden.

**Tabelle 10. Topographie der PEI-Filme unter Selektionsbedingungen und nach der Aptamerbindung im Vergleich zur nativen Polymeroberfläche. (Arithmetrischer Mittelwert ± Standardabweichung; n = 6)**

	mittlere Rauigkeit [nm]	Scan Kantenlänge [µm]		
		5	15	50
unbehandelt	R <sub>a</sub>	2,0 ± 2,0	2,7 ± 3,0	2,9 ± 3,0
	R <sub>q</sub>	2,8 ± 2,5	3,9 ± 4,4	4,4 ± 4,7
Selektions- puffer	R <sub>a</sub>	4,9 ± 3,7	5,4 ± 3,1	3,6 ± 0,7
	R <sub>q</sub>	7,7 ± 6,3	9,0 ± 5,6	8,2 ± 3,8
Aptamere	R <sub>a</sub>	3,2 ± 1,3	3,9 ± 2,2	7,2 ± 4,6
	R <sub>q</sub>	4,3 ± 1,8	5,8 ± 3,1	10,6 ± 5,8

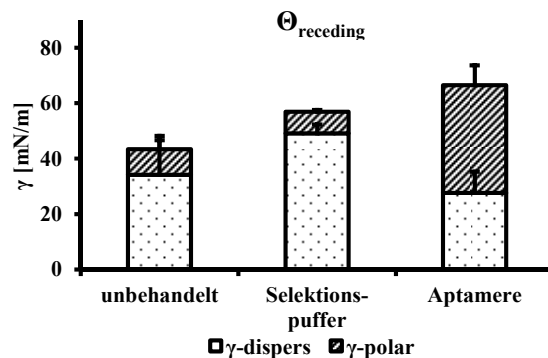
**Benetzungseigenschaften und Oberflächenenergie**

Die Bindung der angereicherten Aptamere aus Selektionsrunde elf führte auf PEI zu einer signifikanten Verringerung beider Kontaktwinkel und einer deutlichen Veränderung des Benetzungsverhaltens. (Tabelle 11) Hierbei war die Änderung des zurückziehenden Kontaktwinkels  $\Theta_{\text{rec}}$  stärker ausgeprägt, was in einer erhöhten Hysterese resultierte. Die beschriebenen Effekte traten nur in Verbindung mit den Aptameren auf. Eine Inkubation der PEI-Filme unter Selektionsbedingungen zeigte keinen Effekt auf die Benetzungseigenschaften des Polymers.

**Tabelle 11. Kontaktwinkel und Oberflächenenergie Aptamer behandelte PEI-Filme.** DNA behandelte PEI-Filme im Vergleich zu nativem und mit Selektionspuffer inkubiertem Polymer. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 20)

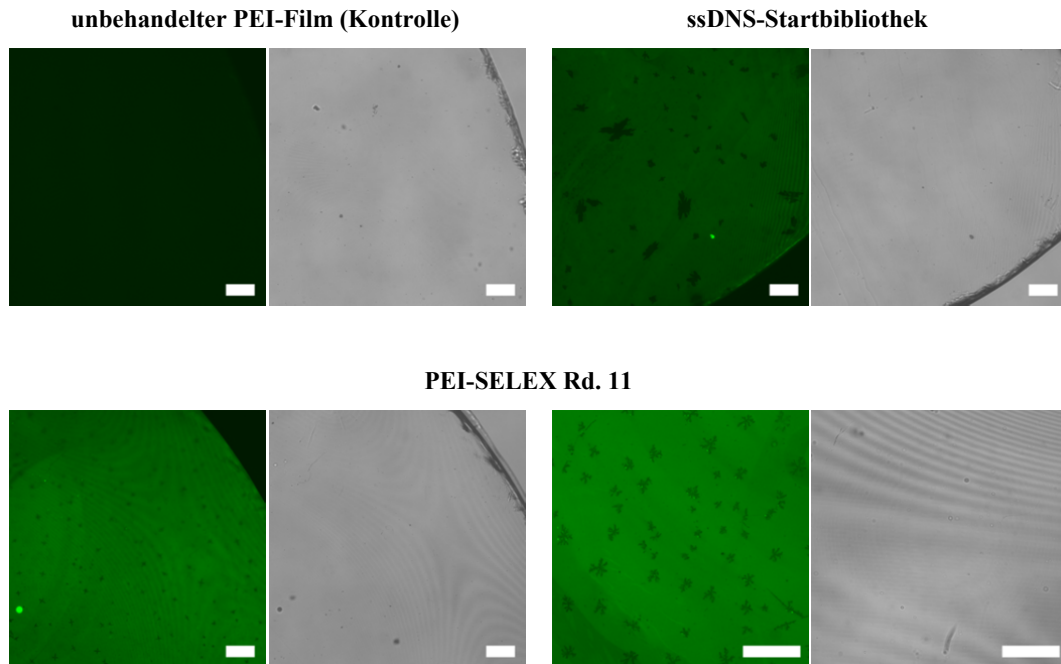
		Kontaktwinkel [°]		Oberflächenenergie [mN/m]		
		Wasser-Luft	Hexadecan-Wasser	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma$
unbehandelt	$\Theta_{\text{adv}}$	87,2 $\pm$ 1,4	142,4 $\pm$ 6,0	0,6 $\pm$ 0,2	49,4 $\pm$ 4,3	50,0 $\pm$ 4,1
	$\Theta_{\text{rec}}$	70,5 $\pm$ 2,6	99,6 $\pm$ 7,3	9,2 $\pm$ 3,2	34,2 $\pm$ 14,0	43,4 $\pm$ 10,8
	Hyst	16,7 $\pm$ 2,3	42,8 $\pm$ 7,3			
Selektions-puffer	$\Theta_{\text{adv}}$	85,8 $\pm$ 1,8	137,2 $\pm$ 5,1	1,0 $\pm$ 0,5	47,4 $\pm$ 7,3	48,4 $\pm$ 6,8
	$\Theta_{\text{rec}}$	63,6 $\pm$ 2,7	104,7 $\pm$ 2,5	7,8 $\pm$ 0,7	49,1 $\pm$ 3,2	56,9 $\pm$ 3,8
	Hyst	22,2 $\pm$ 2,4	32,5 $\pm$ 6,6			
Aptamere	$\Theta_{\text{adv}}$	62,0 $\pm$ 10,4 <sup>****,####</sup>	127,5 $\pm$ 7,6 <sup>****,####</sup>	2,6 $\pm$ 1,6	81,2 $\pm$ 13,9	83,8 $\pm$ 15,4
	$\Theta_{\text{rec}}$	26,9 $\pm$ 3,4 <sup>****,####</sup>	44,9 $\pm$ 10,8 <sup>****,####</sup>	38,9 $\pm$ 7,1	27,7 $\pm$ 7,6	66,5 $\pm$ 0,5
	Hyst	35,2 $\pm$ 8,5 <sup>****,####</sup>	82,5 $\pm$ 5,7 <sup>****,####</sup>			

Ebenso wurde in Selektionspuffer keine nennenswerte Änderung der Oberflächenenergie von PEI detektiert. (Abbildung 35) In diesem als auch in unbehandeltem Zustand trugen zu einem großen Teil disperse Kräfte zur Gesamtoberflächenenergie und damit zur Interaktion mit dem polaren Lösungsmittel bei. Durch die Bindung der polyanionischen Aptamere an die PEI-Oberfläche nahm der polare Anteil an der Grenzflächenenergie stark zu. Gleichzeitig verringerte sich jedoch auch in annähernd gleichem Maß der dispers vermittelte Teil der Oberflächenenergie.



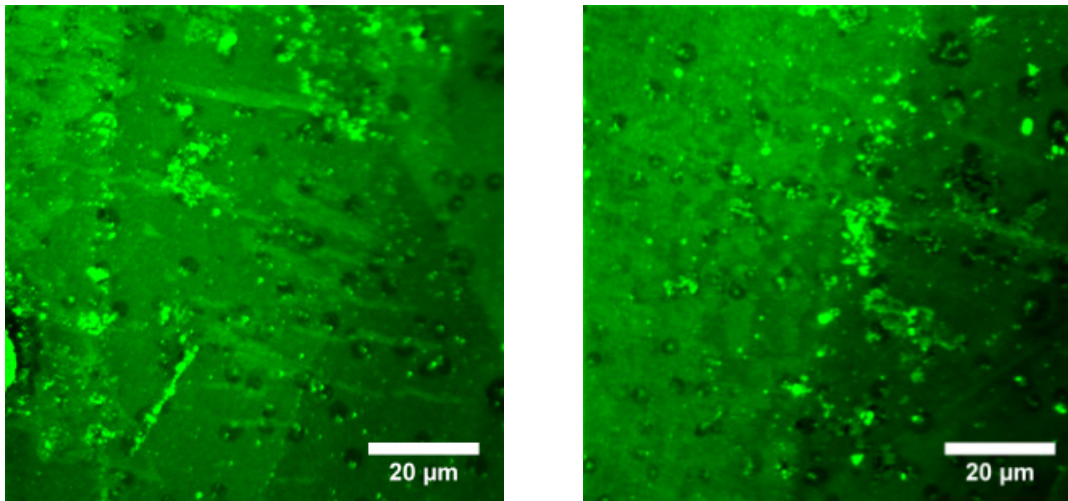
**Abbildung 35. Veränderung der Oberflächenenergie nach Aptamerbindung auf PEI-Filmen.** Geringe Veränderung der Oberflächenenergie, jedoch starke Verschiebung der polaren und dispersen Anteile nach Aptamerbindung an die PEI-Film Oberfläche. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 20)

*Visualisierung der Materialbindung mittels Fluoreszenzmikroskopie*



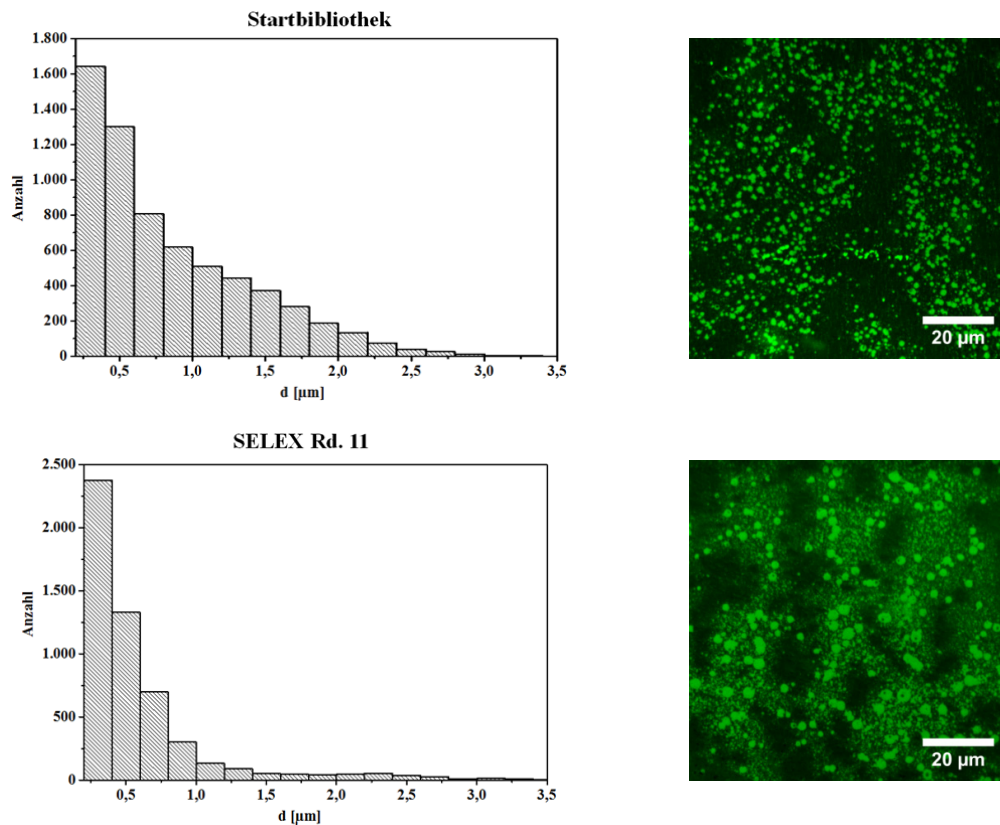
**Abbildung 36. Visuelle Evaluation der verstärkten PEI-Film Bindung von AlexaFluor647-modifizierten Aptameren der PEI-SELEX Runde elf.** Höhere Fluoreszenzintensität auf den PEI-Filmen nach Inkubation mit der angereicherten ssDNS-Bibliothek im Vergleich zur Startbibliothek und dem unbehandelten Polymer. (Dokumentation mittels cLSM bei 10- bzw. 20-facher Primärvergrößerung; Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ )

Für die visuelle Evaluierung einer gesteigerten Materialbindung wurde die Detektion der an die PEI-Oberfläche gebundenen Aptamere mittels Fluoreszenz markierter ssDNS und dem cLSM gewählt. Hierzu wurden sowohl die Sequenzen der angereicherten als auch der Ausgangsbibliothek mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor647 modifiziert. Die Untersuchung der PEI-Filme, welche mit der Startbibliothek inkubiert wurden, zeigte ein leichtes und fast gänzlich flächendeckendes unspezifisches Hintergrundsignal der ssDNS. (Abbildung 36) Im Vergleich zur Ausgangsbibliothek war das Fluoreszenzsignal der angereicherten Aptamere qualitativ deutlicher und ebenso über annähernd die gesamte PEI-Oberfläche detektierbar. Erst bei höheren Primärvergrößerungen ( $\geq 20$ -fach) wurden kleinere Bereiche mit verringertem Fluoreszenzsignal erkennbar. Diese Bereiche ohne Fluoreszenz waren morphologisch mit den durch AFM nachgewiesenen Kavitäten identisch. Bei näherer Betrachtung an der Auflösungsgrenze der mikroskopischen Methode (bei 100-facher Primärvergrößerung) war nach wie vor eine flächendeckende Aptamerbindung, jedoch auch vereinzelte Aptameraggregate in der Größenordnung  $\leq 1 \mu\text{m}$  an der Polymeroberfläche zu erkennen. (Abbildung 37)



**Abbildung 37. Hochauflösende Darstellung AlexaFlour647-modifizierter Aptamere auf PEI-Filmen.** Flächendeckende Aptamerbindung sowie kleinere Aptameraggregate auf PEI-Filmen nach Inkubation mit der angereicherten ssDNS-Bibliothek. (Dokumentation mittels cLSM bei 100-facher Primärvergrößerung)

### 6.4.3. Neigung der Aptamere zur Aggregatbildung und deren Verteilung

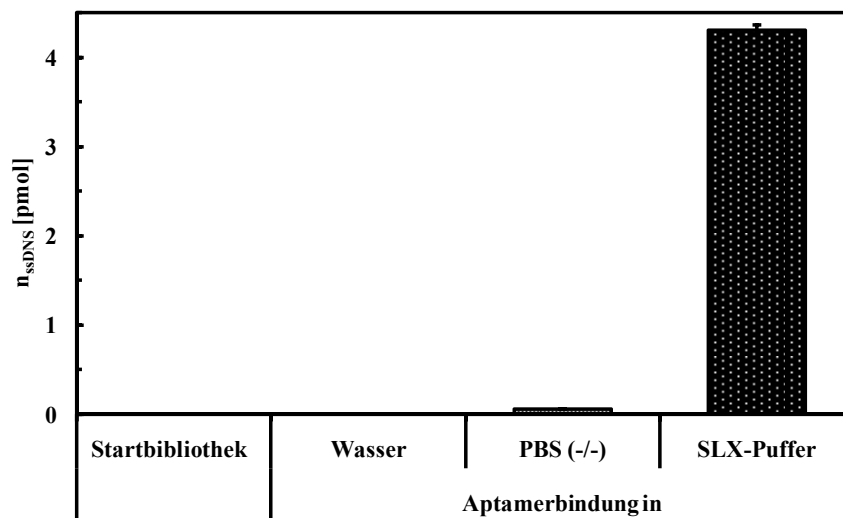


**Abbildung 38. Größenverteilung aggregierter AlexaFlour647-modifizierter Aptamere in Lösung.** Invers proportionale Abhängigkeit zwischen Größe und Anzahl der detektierten Aptameraggregate. (Dokumentation mittels cLSM bei 100-facher Primärvergrößerung)

Da DNS-Moleküle aufgrund ihrer natürlichen Struktur dazu neigen, Entropie getrieben ihre hydrophoben Basen vor dem polaren Lösungsmittel abzuschirmen und eine minimal hydrophobe Form einzunehmen, wurde ebenso das Aggregationsverhalten der Aptamere vor dem eigentlichen Kontakt mit der polymeren Matrix untersucht. Entsprechende DLS-Studien zur Ermittlung des hydrodynamischen Volumens einzelner als auch aggregierter DNS Moleküle verliefen aufgrund der hohen Polydispersität innerhalb einer Aptamerlösung ergebnislos. Weitergehende semiquantitative mikroskopische Untersuchungen fluoreszenzmarkierter Aptamere in Lösung (Selektionspuffer) zeigten die Formierung von Aptameraggregaten. (Abbildung 38) Deren Größe und Verteilung unterschied sich erheblich zwischen der unselektierten Startbibliothek und den angereicherten Aptameren. Bis hin zur Auslösungsgrenze der mikroskopischen Methode ( $\sim 300$  nm) zeigten diese im Vergleich zur Startbibliothek ein geringeres Auftreten von Aggregaten  $>1$   $\mu\text{m}$ . Hinsichtlich der Verteilung verhielt sich die Anzahl detektierter DNS-Partikel bei allen untersuchten Proben umgekehrt proportional zu deren Größe.

#### 6.4.4. Einfluss mono- und divalenter Kationen auf die Aptamerbindung

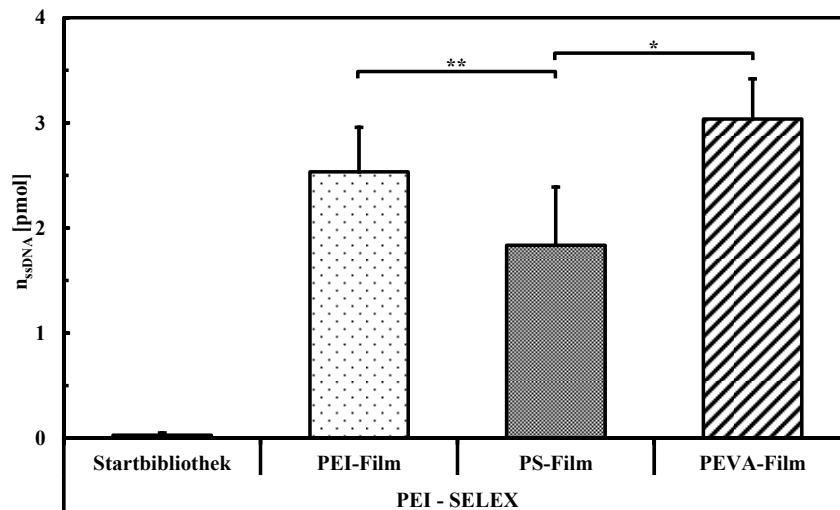
Vergleichende Bindungsuntersuchungen mit unterschiedlichen Kompositionen des umgebenden polaren Lösungsmittels offenbarten die Abhängigkeit der Aptamerbindung von divalenten Kationen. (Abbildung 39) Ohne die Präsenz von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (SLX-Puffer) war die Aptamerbindung in PBS (-/-), welches nur monovalente Metallionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) enthielt, um den Faktor 70 verringert. ( $n_{\text{SLX-Puffer}} = 4,3 \pm 0,1$  pmol;  $n_{\text{PBS(-/-)}} = 60,0 \pm 0,2$  fmol) Dennoch zeigte sich im Vergleich zur Hintergrundbindung der unselektierten Ausgangsbibliothek, welche in SLX-Puffer durchgeführt wurde, in PBS (-/-) noch immer eine mehr als 20-fach stärkere Affinität der angereicherten Aptamere zur PEI-Oberfläche. ( $n_{\text{PBS(-/-)}} = 60,0 \pm 0,2$  fmol;  $n_{\text{Startbibliothek}} = 2,6 \pm 0,5$  fmol) Das vollständige Fehlen von Metallionen im umgebenden Lösungsmittel resultierte in einer an die PEI-Oberfläche gebundenen Aptamermenge nahe der Nachweisgrenze. ( $n_{\text{Wasser}} = 0,2 \pm 0,0$  fmol)



**Abbildung 39. Bindungstest angereicherter Aptamere aus Selektionsrunde elf der PEI-SELEX in Abhängigkeit von mono- und divalenten Kationen.** Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Materialbindung von der Präsenz divalenter Kationen im umgebenden Lösungsmittel. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

#### 6.4.5. Materialelektivität der angereicherten Selektionsbibliothek

Um die Selektivität der angereicherten Aptamere für PEI zu überprüfen, wurden Bindungsstudien der angereicherten Bibliothek mit anderen polymeren Biomaterialien durchgeführt. Als weitere Testpolymere dienten hierbei Filme aus Polystyrol (PS) und Poly(ethylen-co-vinylacetat) (PEVA), welche bereits während der Gegenselektion zum Einsatz kamen. Die Ergebnisse der qPCR-Quantifizierung Material gebundener Aptamere ergaben, dass die angereicherten Aptamere der PEI-SELEX keine Materialelektivität oder -präferenz hinsichtlich der getesteten Polymere zeigte. (Abbildung 40) Die angereicherten Aptamere hatten eine annähernd vergleichbare Bindungsaffinität zu PEVA, wobei die quantitative Bindung an PS signifikant verringert war. Für ein besseres Verständnis dieser Ergebnisse wurde die angereicherte Bibliothek aus Selektionsrunde elf nachfolgend einer Sequenzierung unterzogen. Mit Hilfe der Sequenzierungsdaten sollte ein tieferer Einblick in die Komposition der Bibliothek gewonnen werden.



**Abbildung 40. Test auf selektive Materialbindung der angereicherten Aptamere aus Selektionsrunde elf der PEI-SELEX.** Es zeigte sich eine, vergleichbare Bindungsaffinität der angereicherten Aptamere an Polymerfilme aus PEI, PS und PEVA. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 6)

#### 6.4.6. Sequenzierung der angereicherten ssDNS-Bibliothek

##### *Primärstrukturanalyse*

Im Rahmen der Sequenzierung wurden 100.000 Sequenzen der bis Runde elf angereicherten Aptamere sequenziert und der von den Primersequenzen flankierte randomisierte Bereich mit bioinformatischen Werkzeugen hinsichtlich der Anreicherung spezifischer Sequenzmotive untersucht. In Abbildung 41 sind die zehn häufigsten Aptamerfraktionen aufgeführt, welche weitergehend in einem Sequenzvergleich hinsichtlich Homologien analysiert wurden. Die Anreicherungen der Motive innerhalb der Bibliothek schwankten zwischen 8,5 und 1,0%, wobei die Summe aus allen zehn Motiven 30% der gesamten analysierten Sequenzen entsprach. Damit bestand ein Großteil der Bibliothek dieser Selektionsrunde aus einer Vielzahl verschiedener angereicherter Sequenzmotive. Der direkte Vergleich der ausgewählten Sequenzmotive und das daraus erstellte phylogenetische Diagramm der Sequenzähnlichkeiten offenbarte eine nahezu 100%-ige Sequenzüber-

einstimmung der Motive PEI-1 und -8 (grün markiert) sowie PEI-3 und -9 (grau markiert). Diese Motive unterschieden sich jeweils nur um eine oder zwei Basen. Jedoch war der verwendete Algorithmus derart strikt, dass diese Unterschiede ausreichten, um diese Motive als unterschiedliche Fraktionen wahrzunehmen. Abgesehen von diesen Ähnlichkeiten zeigten alle zehn Motive eine auffällige Übereinstimmung in ihrer Sequenzstruktur. Der gesamte Zufallsbereich bestand aus einer von Thymin-dominierten zentralen Pyrimidin-reichen Region, welche von GC-reichen Sequenzen flankiert wurde. Aufgrund dieser strukturellen Gleichnisse innerhalb der angereicherten Motive wurden die vier am häufigsten angereicherten Sequenzen PEI-1 bis -4 für weitere theoretische Überlegungen als auch praktische Untersuchungen verwendet.

### ***Strukturelle Analyse der angereicherten Bindungsmotive PEI-1 bis -4***

Für die weitere Untersuchung der Motive PEI-1 bis -4 wurden die Gesamtsequenzen der potenziellen Aptamere (Bindungsmotiv + Primersequenzen) hinsichtlich ihrer zweidimensionalen Faltung als auch ihrer physikalischen Eigenschaften hin betrachtet. Dahingehend erfolgte die Simulation der 2D-Struktur unter zuvor klar definierten Umgebungsbedingungen, wie sie unter Standard Selektionsbedingungen vorhanden waren. Bei dieser Analyse wurde lediglich die angenommene Umgebungstemperatur im Bereich von 4 bis 37 °C variiert, um das strukturelle Verhalten der Aptamere im physiologischen Temperaturbereich einschätzen zu können. Die simulierte Faltung der ausgewählten Motive zeigte für alle (außer PEI-1) die gleiche Grundstruktur. Der Pyrimidin-reiche Sequenzbereich war immer in einer großen Schleife (*Loop*) exponiert und durch einen doppelsträngigen GC-reichen Stammbereich strikt von den Primersequenzen getrennt. (Abbildung 42) Das PEI-1 Motiv zeigte ebenfalls eine hoch organisierte 2D-Struktur, in der die Pyrimidin-reiche Sequenz nicht in einem großen sondern zwei kleineren Schleifen exponiert auftrat. Darüber hinaus war bei diesem Aptamer Kandidaten kein ausgeprägter GC-Stammbereich zu erkennen. Alle der drei angesprochenen Strukturmerkmale interagierten bei PEI-1 untereinander, so dass keine klar definierten Strukturbereiche innerhalb der Sequenz bestanden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass diese komplexe 2D-Struktur des PEI-1 in der Simulation nur bei 4 °C stabil war. Bei höheren Temperaturen gingen die intramolekularen Interaktionen verloren und das Aptamer bildete lediglich eine große Schleife ohne jegliche organisierte Faltung. Die Motive PEI-2 und -3 hingegen waren in der gezeigten 2D-Struktur im gesamten simulierten Temperaturbereich stabil und PEI-4 bis Raumtemperatur (20 °C).

### **6.4.7. Bindungstests mit PEI-Aptamer Kandidaten**

#### ***Bindungstests mit Einzelaptameren***

Nach der Durchführung der quantitativen Bindungsexperimente mit den generierten Einzelaptameren PEI-1 bis -4 war zu erkennen, dass diese eine deutlich stärkere Materialbindung als die Startbibliothek aufwiesen, jedoch ebenso eine geringere Affinität zeigten als vergleichsweise die angereicherte Bibliothek der Selektionsrunde elf. (Abbildung 44) Die Bindung der angereicherten Aptamere war im direkten Vergleich etwa doppelt so stark wie bei den Motiven PEI-3 und -4 sowie 5-fach so hoch wie bei PEI-1 und -2. Auffallend war hierbei ebenfalls der Umstand, dass es zwischen den Motiven 1 und 2 sowie 3 und 4 keine Unterschiede hinsichtlich der Materialaffinität zu geben schien.

## VI. ERGEBNISSE

Motiv	Sequenz (ohne Primer)	Anteil (von 100.000)
1	CGCGCAATATCTTCATTTCTTTGTTTTTTTTCTCGTATTTTCATGCCGG	8.569
2	GACACCCATCCGCGTTACTTCTTCTTCATTTTTCTTGTTCCTGGCAG	5.284
3	CGGCCACCCTAGCATTTCCCTTTTCTTTACCTTTTTTTCTCGGAGGG	4.453
4	GGCCGAGCGGTCTTACATTTCTTTCATTTCTTTACACTTCATTTACCGC	3.219
5	CGCGTGCATTCTTTTTGTGCTTCTTTTTTTCATTTTTCTGCTCGTG	2.361
6	GTGAGTCCCTCCGTAATTCGTTTTATTTTTTCTCGTTTTTCATGGCAG	1.632
7	ACGGGCTCATTTCTCGGTTTTTCATTGTTTTGTTTATTTTACCGTGCGGC	1.493
8	CGCGCAATATCTTCATTTCTTTGTTTTTTTTCTCGTATTTTCATGCCGGG	1.210
9	CGGCCACCCTAGCATTTCCCTTTTCTTTACCTTTTTTTCTCGGAGGGA	1.193
10	GCGTCTAATCGACATTTTTCTTTTTTACTTTTTACTCTTGTCTCGTGC	956

```

PEI 1 - C G C G C A A T A T C T T C A T T T T C T T T G T T T T T T - T T C T C G T A T T - - T C A T G C C G G - - - -
PEI 8 - - G C G C A A T A T C T T C A T T T C T T T G T T T T T - T - C T C G T A T T - - T C A T G C C G G G - - - -
PEI 2 - - G A C A C C C A T C C - - G C G T T A C T - T C T T C T T T C A T T T T T T C T T G T T C T T G C G A G - - - -
PEI 3 - - - C G G C C A C C C T A G C A T T T C C - T T T T C T T T - A C C T T T T T T T - C C T C G C G A G G G - - - -
PEI 9 - - - C G G C C A C C C T A G C A T T T C C - T T T T C T T T - A C C T T T T T T - - C C T C G C G A G G G A - - - -
PEI 4 - G G C C G A G C G G T C T T A C A T T C - - - T T T T C A T T - T C T T T A C A C T T C A T T T A C C G C - - - -
PEI 5 - - C G C G T G C A T T C T - - - T T T T G T G T C T T T C T T - T T T T C A T T T C T T C T G C T C G T G - - - -
PEI 6 - - G T G A G T C C T C C - - G T A A T T C G T T T T A T T T T T C T C G T T T T - C A T T G G C A G - - - -
PEI 7 - - - - - A C G G G C T C A T T C T C G G T T T T C A T T - G T T T T G - T T T A T T T T A C C G T G C G G C - - - -
PEI 10 - - - G C G T C T A A T C G A C A T T T T T C T T T T A C T - T T T T A C T C T T G T T C T C G T C G - - - -
    
```

```

PEI 1 - C G C G C A A T A T C T T C A T T T T C T T T G T T T T T - T T C T C G T A T T - - T C A T G C C G G - - - -
PEI 8 - - G C G C A A T A T C T T C A T T T T C T T T G T T T T T - T - C T C G T A T T - - T C A T G C C G G G - - - -
PEI 2 - - G A C A C C C A T C C - - G C G T T A C T - T C T T C T T T C A T T T T T C T T G T T C T T G C G A G - - - -
PEI 3 - - - C G G C C A C C C T A G C A T T T C C - T T T T C T T T - A C C T T T T T T T - C C T C G C G A G G G - - - -
PEI 9 - - - C G G C C A C C C T A G C A T T T C C - T T T T C T T T - A C C T T T T T T - - C C T C G C G A G G G A - - - -
PEI 4 - G G C C G A G C G G T C T T A C A T T C - - - T T T T C A T T - T C T T T A C A C T T C A T T T A C C G C - - - -
PEI 5 - - C G C G T G C A T T C T - - - T T T T G T G T C T T T C T T - T T T T C A T T T C T T C T G C T C G T G - - - -
PEI 6 - - G T G A G T C C T C C - - G T A A T T C G T T T T A T T T T T C T C G T T T T - C A T T G G C A G - - - -
PEI 7 - - - - - A C G G G C T C A T T C T C G G T T T T C A T T - G T T T T G - T T T A T T T T A C C G T G C G G C - - - -
PEI 10 - - - G C G T C T A A T C G A C A T T T T T C T T T T A C T - T T T T A C T C T T G T T C T C G T C G - - - -
    
```

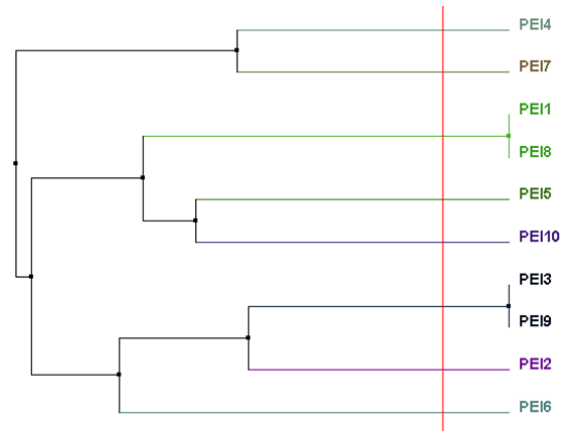
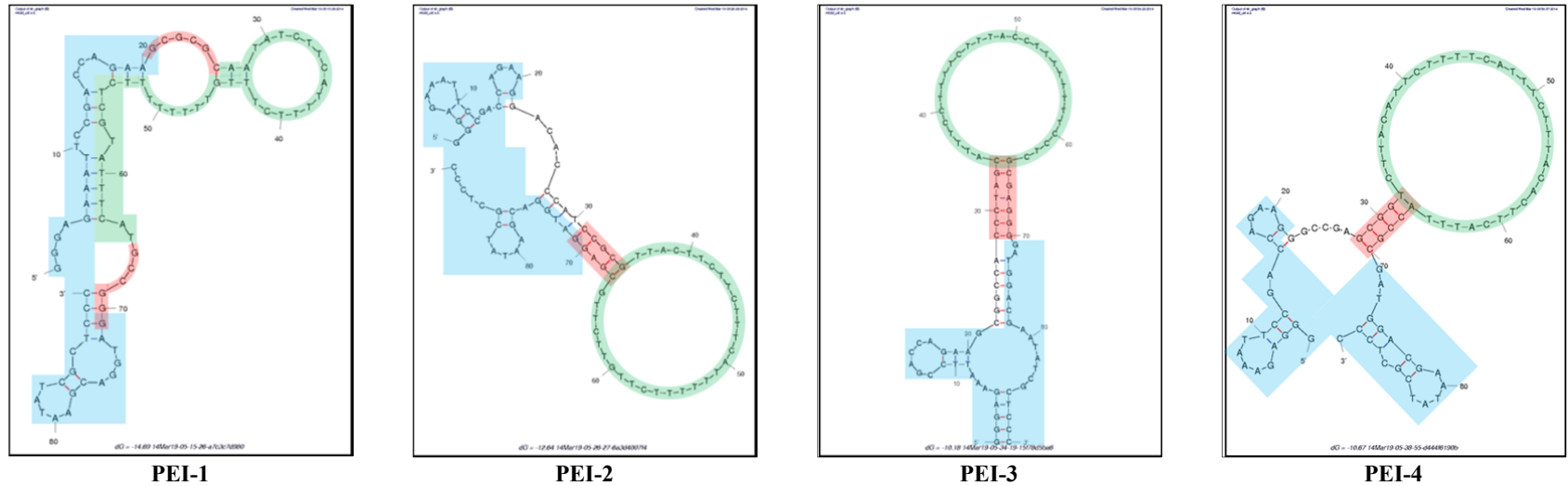


Abbildung 41. Ergebnis der Sequenzierung angereicherter Aptamere der PEI-SELEX Runde elf. Auflistung der 10 häufigsten Sequenzmotive (links) sowie ein Sequenzvergleich (oben rechts) und ein phylogenetischer Stammbaum der Sequenzähnlichkeiten (unten rechts) der Bibliothek aus PEI-SELEX Runde elf.



## VI. ERGEBNISSE



**Abbildung 42. Simulation der 2D-Struktur der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4.** Alle Motive bis auf PEI-1 zeigen eine exponierte Thymin reiche Sequenz (grün), welche klar durch einen doppelsträngigen GC-Bereich (rot) von den Primerregionen (blau) separiert ist.

(A)

PEI-1	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G C G C G C A A T A T C T T C A T T T T C T T T G T T T T T T T T C T C G T A T T T C A T G C C G G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-2	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G G A C A C C C A T C C G C G T T A C T T C T T C T T T C A T T T T T T C T T G T T C T T G C G A G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-3	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G C G G C C A C C C T A G C A T T T C C T T T T C T T A C C T T T T T T T C C T C G C G A G G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-4	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G G G C C G A G C G G T C T T A C A T T C T T T T C A T T T C T T A C A C T T C A T T T A C C G C G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
	<div style="background-color: #ADD8E6; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>Primer</b> <div style="background-color: #FF0000; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>GC-Stamm</b> <div style="background-color: #00FF00; width: 30%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>Pyrimidin Motiv</b> <div style="background-color: #FF0000; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>GC-Stamm</b> <div style="background-color: #ADD8E6; width: 15%; display: inline-block;"></div> <b>Primer</b>

(B)

PEI-1	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G C G C G C A A T A T C T T C A T T T T C T T T G T T T T T T T T C T C G T A T T T C A T G C C G G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-2	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G G A C A C C C A T C C G C G T T A C T T C T T C T T T C A T T T T T T C T T G T T C T T G C G A G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-3	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G C G G C C A C C C T A G C A T T T C C T T T T C T T A C C T T T T T T T C C T C G C G A G G G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
PEI-4	G G G A G A A A T T C C G A C C A G A A G G G C C G A G C G G T C T T A C A T T C T T T T C A T T T C T T T A C A C T T C A T T T A C C G C G A T G G A C G A A T A T C G C T C C C
	<div style="background-color: #ADD8E6; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>Primer</b> <div style="background-color: #FF0000; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>GC-Stamm</b> <div style="background-color: #00FF00; width: 30%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>Pyrimidin Motiv</b> <div style="background-color: #FF0000; width: 15%; display: inline-block; margin-right: 5px;"></div> <b>GC-Stamm</b> <div style="background-color: #ADD8E6; width: 15%; display: inline-block;"></div> <b>Primer</b>

**Abbildung 43. Sequenzvergleich der Aptamerkandidaten PEI-1 - 4.** Alignment der vier häufigsten Bindungsmotive der PEI-SELEX. (A) Nucleotide farblich nach Basen und (B) nach Purin/Pyrimidin kodiert. (rot = Purine; blau = Pyrimidine)

**Bindungstests äquimolarer Mischungen der Aptamerkandidaten**

Um der Aufklärung der zuvor beobachteten Besonderheiten bei der Materialbindung näher zu kommen, wurden weitergehende Bindungsversuche der Aptamerkandidaten gegen die Oberfläche der PEI-Filme durchgeführt. Ein Indiz lieferte hierbei schon der Fakt, dass die angereicherte Bibliothek durchweg eine höhere Affinität zum Polymer zeigte als die Einzelaptamere. An dieser Stelle sollte untersucht werden, ob die einzelnen Aptamere an die gleiche Zielstruktur der Polymeroberfläche binden und ob zwischen den einzelnen Motiven Interaktionen auftreten, welche die Bindung an der Polymeroberfläche beeinflussen.

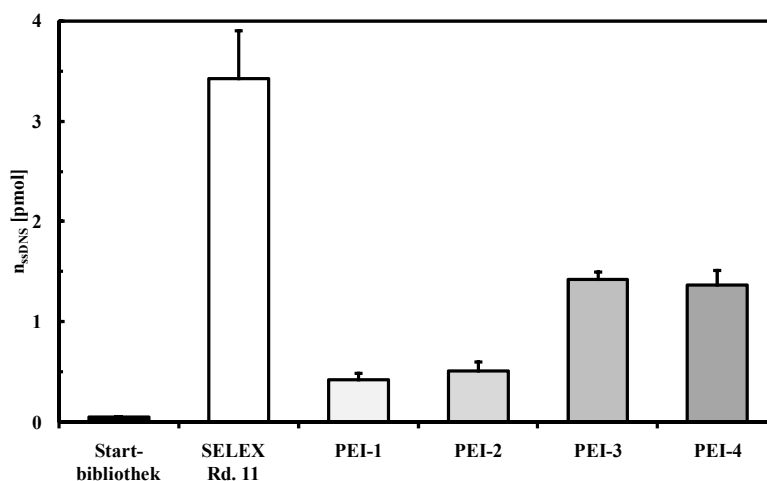


Abbildung 44. Bindungsexperimente der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4 auf PEI-Filmen in Relation zur angereicherten und der Startbibliothek. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 6)

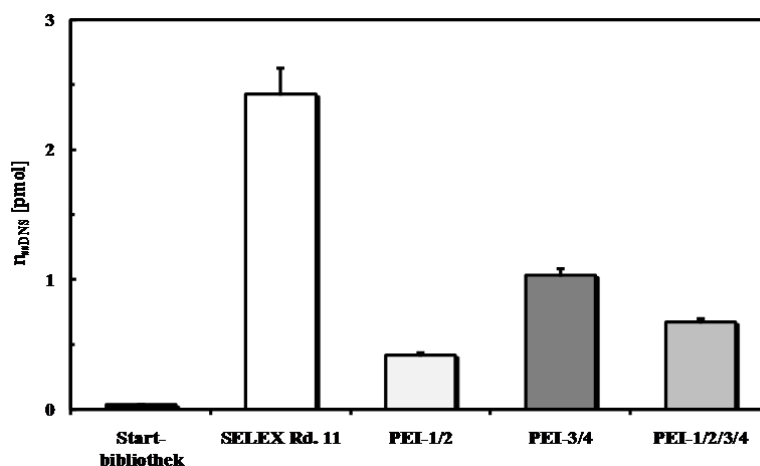


Abbildung 45. Bindungsexperiment äquimolarer Mischungen der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4 auf PEI-Filmen im Vergleich zur angereicherten und der Startbibliothek. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 6)

Hierfür wurden Bindungsversuche mit äquimolaren Mischungen der Motive PEI-1/2, -3/4 sowie aller vier Aptamere im Vergleich zur angereicherten und der Startbibliothek durchgeführt. Die Stoffmenge an ssDNA blieb hierbei für alle Bindungsversuche identisch und lag mit 20 pmol Gesamtmenge für jede Aptamerfraktion (mindestens 5 pmol pro Aptamer) höher als die zuvor

maximal nachgewiesene Menge am Material. Durch die Kombination der schwächer bindenden Aptamere PEI-1/2 als auch der stärker bindenden PEI-3/4 war keine Veränderung hinsichtlich der Materialaffinität, wie zum Beispiel eine Summation der gebundenen DNS-Menge nachzuweisen. Lediglich eine Mischung aus allen vier Aptamerkandidaten zeigte eine quantitative Bindung an die Polymeroberfläche, welche exakt zwischen den anderen beiden verwendeten Mischungen lag. (Abbildung 44 & 45)

### **6.5. Modellsystem zur Aptamer-cRGD unterstützten Endothelialisierung glatter PEI-Filme**

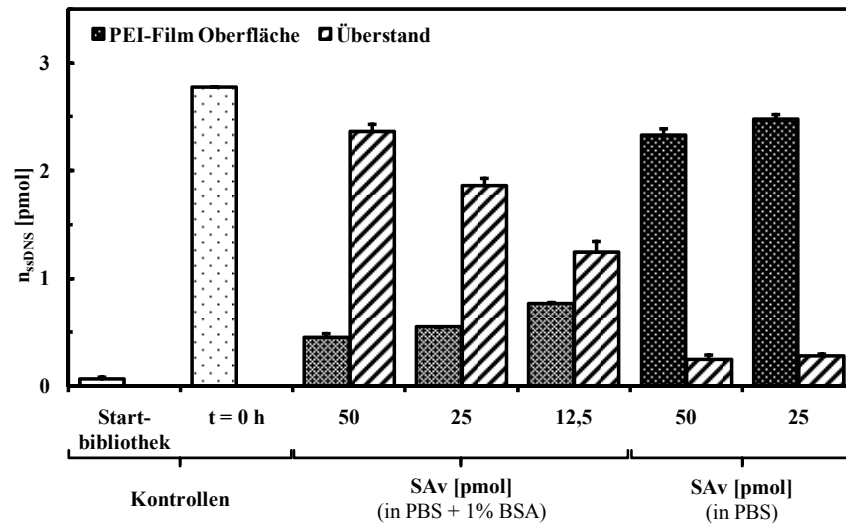
Die vorbereitenden Experimente hinsichtlich der Stabilität der Aptamerbindung unter Zellkulturbedingungen sowie die Anpassung des Zellkultursystems, um eine stabile Aptamerbeschichtung über einen ausreichend langen Zeitraum zu gewährleisten, sind im Anhang aufgeführt. (vgl. 10.5.)

#### **6.5.1. Aptamer unterstützte Immobilisierung des zellbindenden Liganden (cRGD)**

Das Aptamer basierte System zur Stabilisierung ausgesäter Endothelzellen bestand aus zwei Hauptbestandteilen, welche über nicht-kovalente Biotin/Streptavidin Interaktionen miteinander verknüpft wurden. Auf der Aptamerseite befand sich die polymerbindende und auf der anderen mit einem zyklischen RGD-Peptid (cRGD) die zellbindende Komponente, wobei beide Moleküle mit Biotin modifiziert waren. Für die nicht-kovalente Immobilisierung des zellbindenden Liganden wurde jeder Teilschritt einzeln und aufeinander aufbauend durchgeführt sowie die einzelnen Phasen der Bildung des Multilayers nachgewiesen. Der erste Schritt des Aufbaus war die Biotinylierung der angereicherten Aptamere mittels PCR Amplifikation eines 5'-biotinylierten Forward Primers sowie des nachfolgenden Nachweises einer nach der Modifizierung noch immer vorhandenen Aptamerbindung an PEI. Die Bindungsexperimente wurden erneut nach dem etablierten Selektionsprotokoll durchgeführt und die gebundene DNS mittels qPCR quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten keinen Einfluss der 5'-Biotinylierung auf die Aptamerbindung am Polymer. Die Bindung der Aptamere überstieg mit  $1,31 \pm 0,36$  pmol die unspezifische Hintergrundbindung der Startbibliothek mit  $2,57 \pm 2,42$  fmol um das 500-fache.

Im zweiten Schritt wurde die Zugänglichkeit des Aptamer gebundenen Biotins für Streptavidin (SAv) untersucht. Initial blieben alle Versuche eine Aptamer vermittelte spezifische Biotin-Streptavidin Interaktion auf den PEI-Filmen nachzuweisen erfolglos. Es konnte weder ein Fluoreszenzsignal des mit Phycoerythrin (PE) modifizierten Streptavidins noch das gebundene Protein direkt mit einem hoch sensitiven Protein Detektionsassay nachgewiesen werden. (Biorad Protein Detection Assay I) Ein genauere Blick auf die exakte Zusammensetzung der SAv-Lösung offenbarte das Vorhandensein von BSA (1%) im PBS-Puffersystem. Aus vorangegangenen Untersuchungen hinsichtlich des Verhaltens der Aptamerbindung unter Zellkulturbedingungen (vgl. Anhang 10.5.1.-4.) war bereits bekannt, dass sich bestimmte Proteine negativ auf die Aptamer-Material Interaktion auswirken. Daher musste geklärt werden, ob das Streptavidin selbst einen interferierenden Einfluss auf die Aptamerbindung entfaltet. Entsprechende quantitative Bindungs-

studien unter Verwendung verschiedener Konzentrationen der BSA kontaminierten PE-SAV-Lösung sowie PE-SAV ohne BSA Zusatz offenbarten einen direkt von der BSA Konzentration abhängigen interferierenden Einfluss auf die Polymerbindung der Aptamere. (Abbildung 46) Dieser Effekt trat bei der Verwendung von BSA freiem PE-SAV nicht auf und die Aptamerbindung war mit der Ausgangsbindung zum Zeitpunkt  $t = 0$  h vergleichbar.



**Abbildung 46. Bindung angereicherter Aptamere aus SELEX Runde elf an PEI-Filme in Anwesenheit verschiedener SAV-Lösungen.** Die Aptamerbindung wurde konzentrationsabhängig von SAV mit BSA im Puffer negativ beeinflusst. Dieser Effekt trat bei BSA freiem SAV nicht auf. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

Um die selektive Bindung von Streptavidin an den biotinylierten 5'-Terminus Material gebundener Aptamere zu bestätigen, wurde das PE markierte Protein nach der Bindung mittels cLSM nachgewiesen. (Abbildung 47) Initial wurde durch die Verwendung des Wellenlängenbereiches von PE (ex/em 488/575 nm) eine vergleichsweise hohe Hintergrundfluoreszenz des unbehandelten Polymers nachgewiesen. Dennoch war die Intensität für PE-SAV auf mit Aptameren inkubierten PEI-Filmen signifikant erhöht. Im Vergleich zu diesen Proben zeigten sowohl die unbehandelten Polymerfilme als auch die weiteren Kontrollen mit unspezifisch adsorbierter DNS bzw. SAV eine um den Faktor 2 geringere Fluoreszenzintensität.

Der letzte Schritt beim Aufbau des Aptamer basierten Systems zur Unterstützung der Endothelialisierung war die Überprüfung der Zugänglichkeit des gebundenen Streptavidins für weitere biotinylierte Moleküle wie das zyklische RGD-Peptid, welches später für die Endothelialisierungsexperimente im statischen und dynamischen *in vitro* System zum Einsatz kommen sollte. Der Nachweis einer Bindung von biotinyliertem cRGD wurde auf indirektem Weg durchgeführt, da kein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen RGD existiert, eine weitere Markierung des Liganden zusätzlich zur Biotinylierung nicht möglich und die Verwendung eines Proteinnachweises vor dem Hintergrund einer bereits erfolgten Bindung von SAV bei weitem nicht sensitiv genug war. Aus diesem Grund wurde für den Nachweis der Bindung weiterer biotinylierter Moleküle an SAV eine doppelsträngige DNS-Sonde eingesetzt. Diese Sonde war an einen

5'-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor647 und am anderen mit Biotin modifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass es sowohl beim PEI-Film ohne vorherige Behandlung mit den PEI-bindenden Aptameren (PEI-Film + SAV + dsDNS-Sonde) als auch beim zuvor mit der Startbibliothek inkubierten PEI-Film (PEI-Film + Startbibliothek + SAV + dsDNS-Sonde) einen leichten Anstieg des Hintergrundfluoreszenzsignals im Vergleich zum nativen Polymer gab. (Abbildung 47) Ungeachtet dessen war auf dem im ersten Schritt mit PEI-bindenden Aptameren behandelten Film ein deutlich stärkeres Signal der Sonde zu erkennen, wenn dieser im zweiten Bindungsschritt ebenso mit Streptavidin beschichtet wurde. Ließ man das Verbindungsmolekül weg, so war auch kein erhöhtes Fluoreszenzsignal für die Bindung weiterer biotinylierter Moleküle detektierbar.

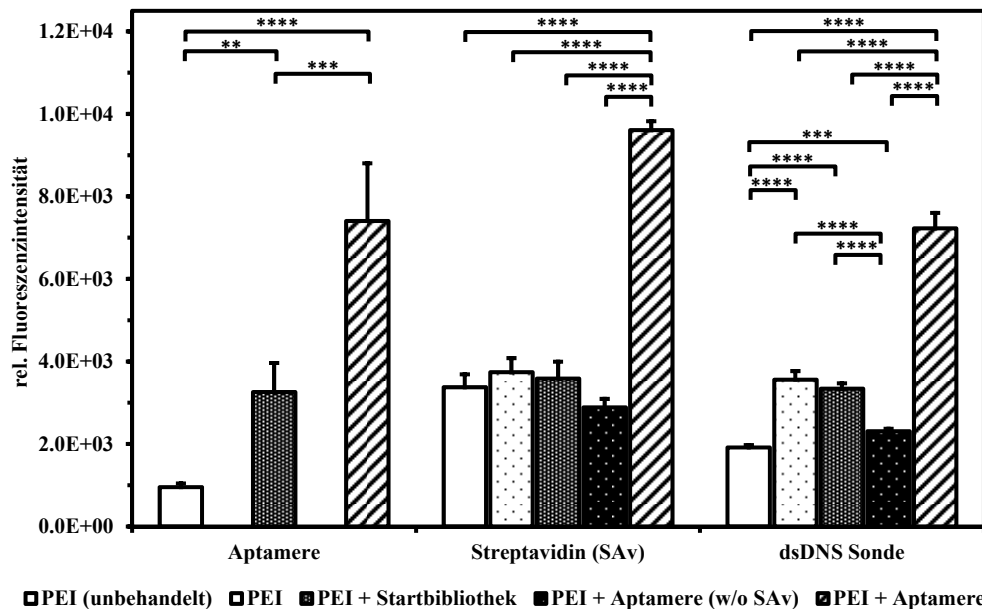
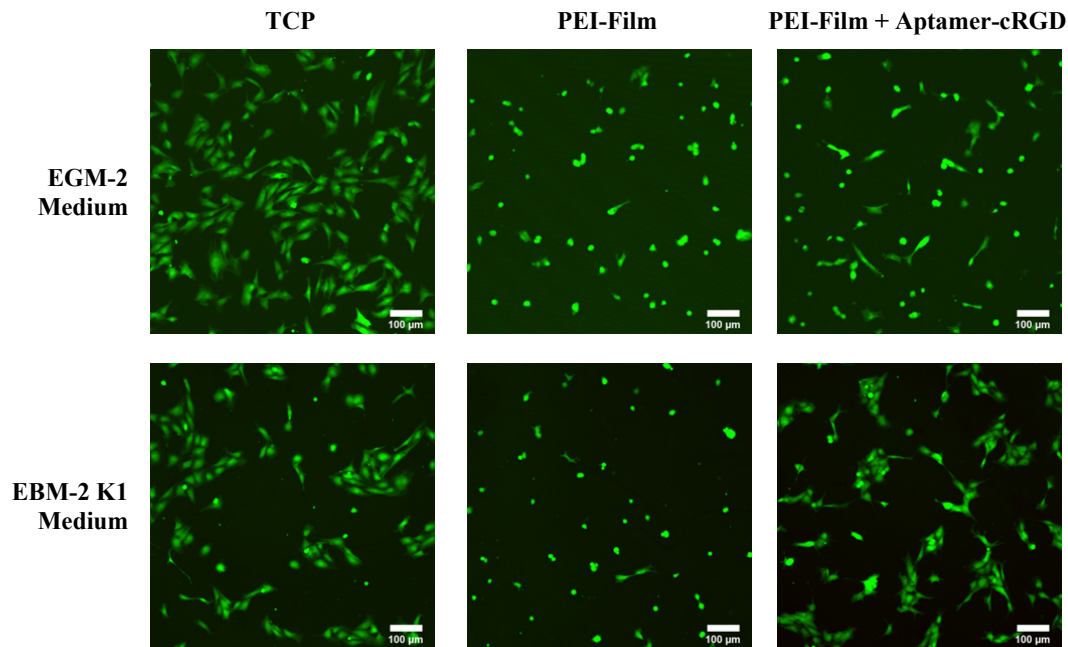


Abbildung 47. Fluoreszenzintensitäten nach Bindung von AlexaFluor647 modifizierten Aptameren an PEI (links) sowie PE-SAV (mittig) und der AlexaFluor647/Biotin DNS-Sonde (rechts) an PEI gebundene biotinylierte Aptamere. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 6)

### 6.5.2. Endothelialisierung glatter PEI-Filme mittels Aptamer immobilisiertem cRGD

#### Statisches *in vitro* Modell

Nach der durch Aptamere vermittelten nicht-kovalenten Immobilisierung des zellbindenden Liganden wurde im Anschluss seine Funktionalität hinsichtlich einer Verbesserung der Endothelialisierung der PEI-Filme untersucht. Hierbei sollten primär Veränderungen der initialen Adhärenz der HUVEC untersucht werden. Die Experimente im Rahmen des statischen Wachstumsmodells beinhalteten die Aussaat primärer HUVEC auf dem unbehandelten Polymer im Vergleich zu PEI-Filmen, welche nach dem zuvor beschriebenen Protokoll mit Aptamer-cRGD beschichtet wurden. Hierbei kamen die zwei unter 10.5.4./5. beschriebenen Zellkultursysteme zum Einsatz. Zum einen wurden Aussaatversuche im für die HUVEC optimierten EGM-2 Medium durchgeführt, bei dem jedoch nachweislich nur ein geringer Teil der Aptamere auf dem PEI verblieb. Zum anderen wurden vergleichbare Versuche im EBM-2 K1 durchgeführt, bei dem die Aptamerbeschichtung auf der Polymeroberfläche stabil war.



**Abbildung 48. Vitalität und Adhärenz primärer HUVEC acht Stunden nach der Aussaat in EGM-2 Voll- und EBM-2 K1 Medium.** Aussaat von HUVEC auf unbehandeltem sowie mit dem Aptamer-cRGD beschichteten PEI-Film und TCP als Wachstumskontrolle. Lebende Zellen wurden mittels Fluoresceindiacetat (FDA; grün) und tote Zellen mit Propidiumiodid (PI, rot) gefärbt. (Bildokumentation mittels cLSM bei 10-facher Primärvergrößerung; Maßstab: 100 µm)

Acht Stunden nach der Aussaat wurde die Morphologie, Vitalität sowie Zelldichte ausgesäeter HUVEC mittels Vitalitätsfärbung bestimmt. Bei der Zellzählung wurde zusätzlich zwischen morphologisch adhären (ausgebreiteten) und schwach adhären (kugelförmigen) Zellen unterschieden. Die visuelle Untersuchung der initialen Zelladhärenz in beiden getesteten Zellkultursystemen zeigte klare Unterschiede bei den auf TCP ausgesäten Zellen. Morphologisch waren die HUVEC in EGM-2 weiter ausgespreizt und bedeckten den Boden der Kavität annähernd gleichförmig. Im Gegensatz dazu zeigten die HUVEC in EBM-2 K1 eine ausgeprägtere Spindel-form und bildeten vermehrt Zellcluster. Allerdings ergaben sich quantitativ bei der Auszählung keine signifikanten Unterschiede sowohl in der Gesamtzelldichte als auch im Verhältnis von adhären zu kugelförmigen Zellen. (Abbildung 48 & 49) Dem gegenüber waren auf den unbehandelten PEI-Filmen in beiden Zellkultursystemen nur wenige ausgebreitete Endothelzellen zu erkennen. Ein Großteil der anhaftenden HUVEC war auf nativem PEI-Film kugelförmig. Hierbei unterschieden sich alle beurteilten Parameter (Gesamtzelldichte sowie Anzahl ausgebreiteter und kugeligere Zellen) stets signifikant von den Aptamer-cRGD beschichteten PEI-Filmen und der Referenz. Die Beschichtung der PEI-Filme mit Aptamer-cRGD bewirkte im EGM-2 nur eine geringe Veränderung auf das Adhärenzverhalten der Endothelzellen. Morphologisch zeigten sich im Vergleich zum unbehandelten PEI mehr Zellen ausgebreitet und die Gesamtzellzahl als auch die Menge ausgebreiteter Zellen war signifikant erhöht. Jedoch waren diese Veränderungen nur marginal und die Zelldichte deutlich niedriger als bei der Referenz. Im Gegensatz dazu zeigten sich in EBM-2 K1 Medium deutliche Unterschiede zwischen unbehandeltem und beschichtetem

PEI. Die in diesem Zellkultursystem nachweislich stabile Aptamerbeschichtung bewirkte eine signifikante Erhöhung der Anzahl ausgebreiteter Zellen, als auch der Gesamtzellzahl. Zusätzlich verringerte sich die Anzahl kugeligter Zellen im Vergleich zum reinen Polymer ebenfalls signifikant. Morphologisch verhielten sich die HUVEC auf dem beschichteten PEI-Film vergleichbar zur TCP Kontrolle und bildeten ebenfalls kleinere Zellcluster. Dennoch war die Gesamtzellzahl, wenn auch nur geringfügig, nach wie vor signifikant verringert.

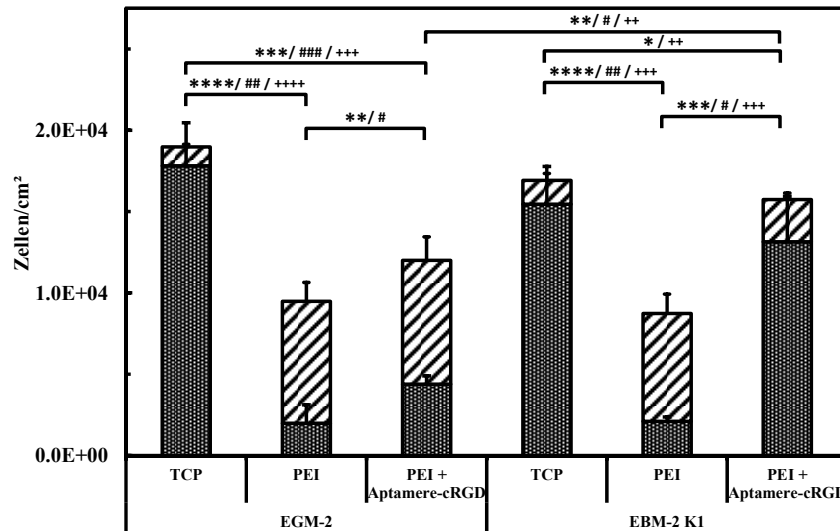


Abbildung 49. Zelldichte primärer HUVEC (▨ Anteil kugeligter Zellen; ■ Anteil ausgebreiteter Zellen) nach acht stündiger Aussaat in EGM-2 und EBM-2 K1 Medium auf unbehandelten sowie mit Aptamer-cRGD funktionalisierten PEI-Filmen und TCP als Kontrolle. (Arithmetischer Mittelwert ± Standardabweichung; # Signifikanz Gesamtzellzahl; \* Signifikanz adhärenter Zellen; + Signifikanz kugeligter Zellen; #,\* p < 0,05; ##,\*\*\*,+ p < 0,005; ###,\*\*\*,\*+++ p < 0,0005; \*\*\*\*,\*++++ p < 0,0001; n = 6)

### Dynamisches in vitro Modell

Nach dem Nachweis der Funktionalität der Aptamer-cRGD Beschichtung im EBM-2 K1 Zellkultursystems unter statischen Bedingungen sollte im Folgeschritt die Frage einer verbesserten Scherresistenz der Endothelzellen im dynamischen System untersucht werden. Hierfür wurden die HUVEC unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen ausgesät und 8 h nach der Aussaat für zwei Stunden geschert. Als Referenzmaterial wurde wie bei früheren rheologischen Experimenten Glas verwendet. Die Dokumentation und nachfolgende Bestimmung der Zelldichte erfolgte lichtmikroskopisch sowohl vor als auch nach der Scherung, wobei jedoch nur sichtbar adhären-te (ausgebreitete) Zellen beachtet wurden.

Vor der Scherung zeigte sich eine mit dem statischen System vergleichbare Zellmorphologie. (Abbildung 50) Auf dem Aptamer-cRGD beschichteten PEI-Film sowie der Kontrolle bildeten die adhären-ten HUVEC vermehrt Zellcluster und zeigten eine ausgeprägte Spindelform. Demgegen-über waren auf dem unbehandelten PEI-Film nur vereinzelt ausgebreitete Endothelzellen zu erkennen. Nach der Scherung war bei allen Materialien eine Verringerung der Zelldichte sichtbar. Die Morphologie der auf dem Material verbliebenen HUVEC war unverändert.

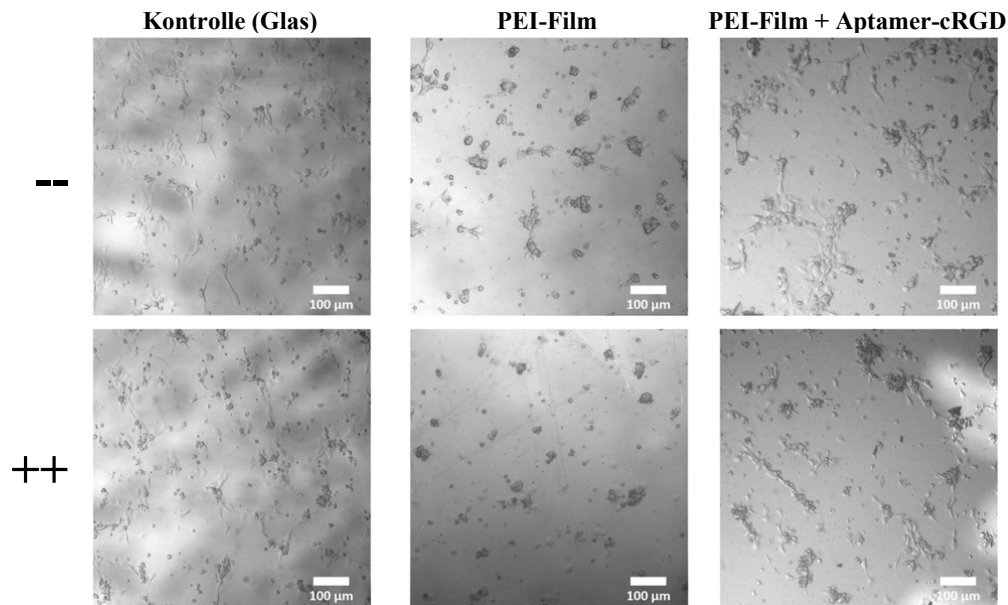


Abbildung 50. Exemplarische Bilder der initialen Endothelzelladhärenz 8 h nach Aussaat in EBM-2 K1 Medium auf nativen sowie mit Aptamer-cRGD funktionalisierten PEI-Filmen und Glas als Kontrolle. ( [--] vor und [++] nach Exposition venöser Scherkräfte für 2 h bei 3 dyn/cm<sup>2</sup>; Maßstab: 100 µm)

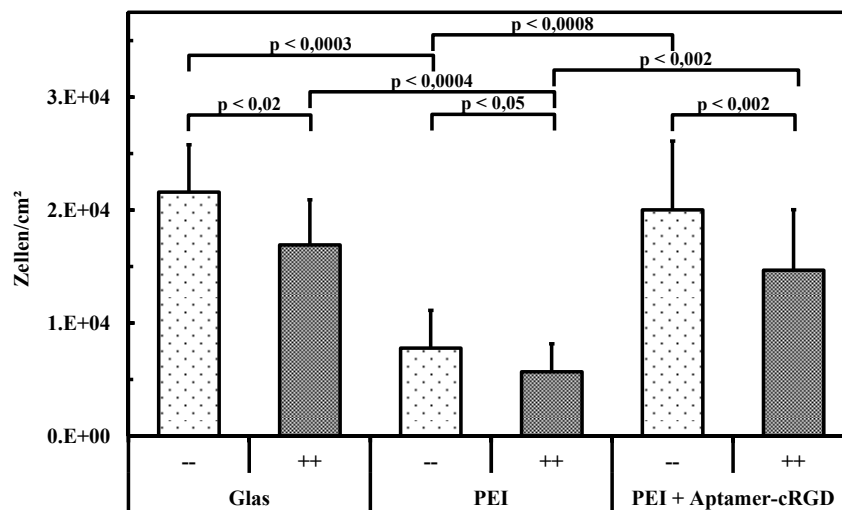


Abbildung 51. Zelldichte primärer HUVEC nach acht stündiger Aussaat in EBM-2 K1 Medium auf unbehandelten sowie mit dem Aptamer-cRGD System funktionalisierten PEI-Filmen und Glas als Kontrolle vor und nach der Exposition venöser Scherkräfte. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Scherung für 2 h bei 3 dyn/cm<sup>2</sup>; vor [--] und nach [++] der Scherung; \* p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\* p < 0,0005; n = 6)

Vor der Scherung war die Zelldichte bei allen getesteten Materialien mit der aus dem statischen System vergleichbar. (Abbildung 51) Nach der Scherung zeigte sich ebenfalls auf allen Materialien eine signifikant verringerte Zelldichte. Im direkten Vergleich des Adhärenzverhaltens der Endothelzellen auf den verschiedenen Materialien waren zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem Aptamer-cRGD beschichteten PEI-Film zu erkennen. Im Gegensatz dazu lag auf dem unbehandelten Polymer stets eine signifikant verringerte Zelldichte im Vergleich zum beschichteten PEI und der Kontrolle vor.



### 7. DISKUSSION

#### 7.1. Grenzflächencharakterisierung der PEI-Filme

Die Grenzflächencharakterisierung des ausgewählten Modellpolymers PEI in Form von Filmen bestätigte die Annahme einer hydrophoben und homogenen Oberfläche dieser Materialform. Bei der physikalisch-chemischen Charakterisierung in der gleichen Größenordnung, in der auch eine Interaktion mit DNS-Molekülen stattfinden würde, wies die Topographie der PEI-Filme eine Rauigkeit von wenigen nm und keinerlei Poren auf. [42] Durch diese Rauigkeit in der gleichen Größenordnung gefalteter Aptamere war eine ausgeprägte Interaktion der Oligonukleotide bzw. ihrer Nukleotidbasen mit der PEI-Oberfläche zu erwarten. Die Aptamere könnten sich in die Oberflächenstrukturen des PEI einpassen und somit in allen drei Dimensionen multivalente physikalische Interaktionen mit dem Polymer eingehen. Ebenso war eine durch die Topographie bedingte Ablagerung größerer Aggregate, wie sie in mikroskopischen Untersuchungen frei in der Lösung detektiert wurden, nicht zu erwarten. Durch ihr vergleichsweise großes hydrodynamisches Volumen würden diese Aggregate während des SELEX-Protokolls von der Oberfläche entfernt. Ein eher überraschender Fund waren sporadisch auftretende sternförmige Kavitäten auf der Polymeroberfläche, deren Dimensionen sich in einer Ausdehnung von 30 - 100  $\mu\text{m}$  und einer Tiefe von nur wenigen Nanometern bewegten. Die Ursache dieser Inhomogenitäten ist unklar. Aufgrund ihrer Morphologie ist jedoch anzunehmen, dass es sich um Artefakte aus der Herstellung handelt. Die fehlende Interaktion von Aptameren an diesen Strukturen lässt sich durch eine mangelnde Benetzung des PEI an diesen Kavitäten erklären und wird an anderer Stelle genauer beleuchtet. Die mittels XPS und Raman Spektroskopie ermittelte chemische Oberflächenzusammensetzung entsprach früheren Studien als auch den Herstellerangaben hinsichtlich der atomaren Komposition als auch vorhandener Oberflächenfunktionalitäten. [201] Die XPS-Regionalspektren der C1s Photoelektronen wiesen durch den hohen prozentualen Anteil von C-C/C=C-Bindungen (>75 %) auf eine erwartungsgemäß durch die aromatischen Systeme dominierte Polymeroberfläche hin. Ebenso wurden deutliche Signale für polare funktionelle Oberflächenkomponenten wie Etherbrücken (C-O-C) als auch Carbonylgruppen (C=O) detektiert, an denen PEI über größere Distanzen elektrostatische Dipol-Dipol Interaktionen mit Aptameren und zu einem bestimmten Maß auch über Ion-Dipol Wechselwirkungen mit Metallionen aus dem umgebenden Lösungsmittel eingehen kann. Dennoch wurde die PEI Oberfläche, wie bereits angesprochen, von hydrophoben Elementen dominiert, was im Kontakt mit Wasser bzw. Selektionspuffer an vielen Stellen zu einer geringen Hydratisierung geführt hat. Die Beobachtungen aus den XPS-Analysen bestätigten sich anhand der aufgenommenen Raman Spektren der PEI-Filme in wässriger Umgebung. Im Rahmen des Mappings der Polymeroberfläche wurden an allen untersuchten Orten vergleichbar starke Molekülschwingungen für aromatische Systeme sowie Carbonylgruppen nachgewiesen, wobei die Raman Intensität letzterer aufgrund der hohen Polarität dieser funktionellen Gruppe im Vergleich zu Schwingungen von aromatischen C-C Bindungen deutlich stärker war. Von daher ist eine quantitative Aussage der die Oberfläche dominierenden chemischen Strukturen mit dieser Methode nur bedingt möglich. Ebenso muss beachtet werden, dass aufgrund der hohen Informationstiefe der Raman Spektroskopie die Aussage hinsichtlich der Oberflächenzusammensetzung der PEI-Filme nur

begrenzt gültig ist. Da die Eindringtiefe des Lasers direkt von der verwendeten Wellenlänge abhängig ist, stammte ein bedeutender Anteil des Signals aus der Matrix unterhalb der eigentlichen Materialoberfläche. Für den verwendeten 533 nm Laser lag die Informationstiefe im Bereich zwischen 300 - 700 nm. [167, 168]

Da die Grenzflächeneigenschaften nicht nur einen Effekt auf die Interaktion der Polymeroberfläche mit niedermolekularen Strukturen wie Oligonukleotiden und Proteinen entfalten sondern sich ebenso auf die Morphologie, Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auswirken [202], war eine Betrachtung der physikalischen Grenzflächeneigenschaften in der makro- und mikroskopischen Größenordnung ebenso von Interesse. Darüber hinaus waren makroskopische Informationen wie das Oberflächenpotenzial, die Benetzungseigenschaften und die Zusammensetzung der Oberflächenenergie ebenfalls wichtige Faktoren für die Einschätzung der initialen Wechselwirkungen zwischen den Aptameren und PEI. Für Biomaterialien mit einer Oberflächenrauigkeit im Nanometerbereich wurde bereits beschrieben, dass diese sich positiv auf die Adhäsion und Proliferation von humanen Endothelzellen auswirkt. [203] Demgegenüber stellt die mittels Tropfenkonturanalyse ermittelte hydrophobe Oberfläche ( $\Theta_{adv} = 87,2 \pm 1,4^\circ$ ) des PEI kein ideales Substrat für das Zellwachstum dar. Ein optimales Zellwachstum wurde stets für polymere Oberflächen mit einer moderaten Benetzbarkeit bei voranschreitenden Kontaktwinkeln um die  $55^\circ$  beschrieben. [204, 205] Eine weitere makroskopische Eigenschaft der PEI-Film Oberfläche war ein leicht negatives Oberflächenpotenzial bei physiologischem pH, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit durch exponierte Carbonyl- und auch Ethergruppen an der Polymeroberfläche hervorgerufen wurde. Durch diese Funktionalitäten konnten, wie bereits beschrieben wurde, Dipol-Dipol und Ion-Dipol Wechselwirkungen vermittelt werden. Koordinative Interaktionen mit Metallionen würden sich hierbei nicht nur förderlich auf die Rekrutierung von Oligonukleotiden über größere Distanzen auswirken, sondern ebenso auf die initiale Adhärenz von Zellen, da deren Membran ebenfalls eine leicht negative Ladung aufweist.

### 7.2. Biologische Evaluierung und Endothelialisierungspotenzial der PEI-Filme

Die Untersuchung der Biokompatibilität eines potenziellen polymeren Materials beinhaltet meist eine initiale indirekte zytotoxische Untersuchung unter der Anzucht einer geeigneten Zelllinie in Eluaten des Polymers. Dies dient dazu, einen möglichen Einfluss eluierender Komponenten aus dem Material auf das Zellverhalten zu untersuchen. Zu diesen Komponenten zählen verbliebenes Lösungsmittel, Monomere, Quervernetzer und andere Substanzen aus dem Herstellungsprozess sowie Abbauprodukte des Polymers durch Inkubation in biologischen Flüssigkeiten bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Aussaat von L929-Fibroblasten [206] im 72h-Eluat der PEI-Filme resultierte in einer erhöhten Zelldichte und dem vermehrten Auftreten von morphologisch größeren Unterstützerzellen. Zusammen mit einer von der Eluatkonzentration abhängigen signifikant erhöhten metabolischen Aktivität der Zellen wurden die PEI-Filme als leicht zytotoxisch eingestuft. Die erhöhte Aktivität der L929-Fibroblasten ließ darauf schließen, dass während der Eluatgewinnung zu einem geringen Teil zytotoxische Substanzen aus dem Polymer in das Zellmedium gelangten. Da es sich bei den PEI-Molekülen um lange Polymerketten ( $M_w = 32.800 \text{ g/mol}$ ) handelt [42], war eine Freisetzung von Monomeren weniger wahrscheinlich als die Freisetzung von minimalen Resten des organischen Lösungsmittels in das Medium sowie die überstehende Atmosphäre. Ebenso hatten

entsprechende GC-Untersuchungen gezeigt, dass Spuren des Lösungsmittels in der überstehenden Atmosphäre nachweisbar waren. (vgl. 10.1.) Trotzdem kann auch die Freisetzung von PEI-Monomeren nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um den störenden Einfluss eluierter Substanzen zu kompensieren und aus ihrem Umfeld zu entfernen, reagierten die Zellen mit einer höheren Proliferation und Stoffwechselrate. Die Untersuchung der Endotoxinbelastung des Materials zeigte, dass keine nennenswerte bakterielle Kontamination gram-positiver Bakterien der PEI-Filme vorhanden war. Die Endotoxinbelastung lag deutlich unterhalb des von der FDA festgelegten Grenzwertes von 0,5 EU/ml. [26] Somit konnten die PEI-Filme in zellbiologischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Im zweiten Schritt der biologischen Evaluierung wurden die Auswirkungen eines direkten Materialkontaktes analysiert. Hierbei wurde die Interaktion der Zellen mit dem Substrat untersucht, um damit eine Einschätzung der Materialkompatibilität sowie der Funktionalität der Zellen auf diesem Material vornehmen zu können. Diese Untersuchung wurde bereits mit dem für spätere Experimente vorgesehenen primären humanen Endothelzellen durchgeführt, da nur mit diesen eine adäquate Einschätzung der Materialkompatibilität möglich war. Die Aussaat von HUVEC auf der Oberfläche der PEI-Filme resultierte 48 Stunden nach der Aussaat in einer geringfügig erhöhten LDH-Aktivität im überstehenden Medium, was auf eine leicht verringerte Zellmembranintegrität hindeutete. Auch die metabolische Aktivität sowie die Zelldichte waren im Vergleich zur Referenz zu diesem Zeitpunkt signifikant verringert. Eine initial verringerte metabolische Aktivität und Proliferation verschiedenster Zelltypen war von diesem Polymer bereits bekannt und wurde auch im Rahmen dieser Studie erneut bestätigt. [144, 153] Trotz der verzögerten Proliferation bildete sich im Laufe von sieben Tagen auf den PEI-Filmen ein geschlossener HUVEC Monolayer mit einer zur Kontrolle vergleichbaren Zelldichte. Der Grund für die verzögerte Konfluenz könnte die hydrophobe Oberfläche der PEI-Filme gewesen sein, welche den Adhäsionsprozess der Endothelzellen beeinflusste. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in der Vergangenheit beim Vergleich der Biokompatibilität von Polymeroberflächen mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften gemacht. Verschiedene Zelltypen zeigten hierbei eine verringerte Interaktion mit hydrophoben im Vergleich zu hydrophilen Biomaterialien, was sich in einer erniedrigten Adhärenz und Proliferation äußerte. [28]

Die initiale Interaktion von Biomaterialien mit dem Organismus besteht meist in der Bildung einer amorphen Schicht aus passiv adsorbierten Proteinen. Die Komposition dieser Proteinschicht ist stochastisch und führt meist zu Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine. Dieser Prozess ist nicht zuletzt von den Grenzflächeneigenschaften des Polymers wie der Benetzbarkeit, Topografie, chemischen Zusammensetzung und Oberflächenladung als auch von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums (z.B. Blut, Serum, Zellkulturmedium etc.) abhängig. [29, 30] Je hydrophober die Materialoberfläche, desto unspezifischer ist die Adsorption, da die meisten Proteine denaturiert vorliegen. Dabei sind in nativer Form innen liegende hydrophobe Aminosäurereste partiell nach außen gekehrt und die biologische Funktion des Proteins kann verändert sein. Der gebildete denaturierte Proteinlayer erschwert nachfolgend eine spezifische Interaktion der Zellen mit der Materialoberfläche, wobei exponierte Plasmamembranrezeptoren wie Integrine die initiale Zelladhäsion und nachfolgende Formierung der extrazellulären Matrix (EZM) beeinflussen. [29]

Für das verzögerte Zellwachstum auf den PEI-Filmen im Vergleich zur Referenz könnte demnach die unterschiedliche Aktivität adsorbierter Proteine verantwortlich gewesen sein. Die Proteine, welche an das vergleichsweise hydrophile TCP (Plasma behandeltes Polystyrol) adsorbierten, lagen in einer eher nativen Konformation vor und unterstützten damit die Zelladhärenz mehr als jene, die in denaturierter Form an die hydrophoben PEI-Filme adsorbiert waren. [204] Ebenso spielten aktiv von den HUVEC sezernierte Adhäsionsproteine mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rolle. Endothelzellen besitzen die Fähigkeit, ihre eigene EZM zu generieren. [28] Hierbei werden für den Aufbau der EZM vorrangig Fibronectin und Kollagen produziert, wobei dieser Prozess mehrere Stunden bis Tage in Anspruch nimmt. [207] Eine langsamere Ausbildung der EZM aufgrund der hydrophoben PEI-Film Oberfläche könnte somit der Grund für die Verzögerung in der initialen Phase der HUVEC Monolayer Formierung auf den PEI-Filmen gewesen sein.

*In vivo* kleiden Endothelzellen das Lumen von Blutgefäßen aus und bilden dabei eine hochselektive permeable Barriere. Zur Beibehaltung der funktionellen Integrität dieser Grenze zwischen dem vaskulären System und dem umliegenden Gewebe sind Zell-Zell Kontakte als auch Zell-Substrat Interaktionen ein entscheidender Faktor. Aus diesem Grund wurde die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts beurteilt, welches durch indirekte Verknüpfung zur EZM bei der Stabilisierung der Zellkontakte beiträgt. Das Aktin-Zytoskelett von HUVEC ist normalerweise in einem netzartigen Muster um den Zellkortex organisiert, wobei die Filamente an den extrazellulären Kontaktpunkten zur EZM und Nachbarzellen verstärkt sind. Hierbei sind insbesondere während der initialen Adhärenz Verknüpfungen zur EZM weitergehend durch Aktinfilamentbündel (sog. Stressfasern) im zentralen Bereich der Zelle verstärkt. [208] Die Stärke der Zelladhäsion kann anhand der Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe beurteilt werden. Diese beinhalten das Aktin-Zytoskelett und verschiedene Adapterproteine wie z.B. Vinkulin, welches ein essentielles Strukturprotein fokaler Adhäsionskomplexe ist. Diese Komplexe sind ein wichtiger Indikator zur Beurteilung der Zelladhäsion und Persistenz, da sie eine Vielzahl grundlegender Zellprozesse wie zum Beispiel die Migration, Proliferation und Übertragung extrazellulärer mechanischer Reize mit regulieren. [209] Aus diesem Grund wurden HUVEC hinsichtlich der Verteilung und Kolokalisation von fibrillärem Aktin und Vinkulin mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierbei zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede bei der Zell-Substrat Interaktion zwischen PEI-Filmen und einer als Kontrolle dienenden Glasoberfläche. Auf beiden Materialien war nach 48 Stunden Wachstum unter statischen Bedingungen das typische netzartige Muster eines subkonfluenten Endothelzellmonolayers sichtbar. Darüber hinaus waren ausgeprägte Stressfasern im zentralen Bereich der Zellen zu erkennen, wie sie für gewöhnlich während des Adhäsionsprozesses auftreten. [210] Die Termini dieser Aktinfasern waren hauptsächlich mit Vinkulin kolokalisiert, was auf eine starke Interaktion der HUVEC mit dem unterliegenden Substrat hindeutet. Gleichbedeutend zeigte das als Saum um die Zellen gefärbte Vinkulin eine ausgeprägte interzelluläre Interaktion an. [211] Im Resultat war kein Anzeichen einer reduzierten Interaktion der Endothelzellen durch das PEI-basierte Substrat ersichtlich.

Voraussetzung für einen potenziellen späteren Einsatz von PEI in kardiovaskulären Applikationen, über seine Funktion als Modellpolymer für die Generierung multivalent bindender DNS-Aptamere hinaus, war der Nachweis der physiologischen Funktionalität der auf PEI gewachsenen Endothelzellschicht. Hier musste ausgeschlossen werden, dass durch das unterliegende Polymer störende

Einflüsse auf die Endothelzellen vermittelt werden, welche beispielsweise eine inflammatorische Zellreaktion induzieren. Ein funktionelles Endothel auf PEI war von besonderer Bedeutung, da dieses *in vivo* maßgeblich an der Regulation der Gefäßhomöostase beteiligt ist. [17-19] Die starke Interaktion zwischen den Zellen und der unterliegenden Matrix sowie die Ausbildung eines geschlossenen Monolayers nach sieben Tagen waren bereits ein Indiz für die Funktionalität des auf PEI gewachsenen Endothelzelllayers. Der Nachweis der regulativen Funktionalität der Endothelzellen auf PEI wurde durch die Analyse der Sekretionsprofile verschiedener vasoaktiver und inflammatorischer Mediatoren erbracht. Die zelluläre Sekretion der vasoaktiven Mediatoren Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) war bei allen untersuchten Proben stets im niedrigen pg-Bereich und damit für PEI als auch für die Referenz im biologischen Wirkungsbereich. Physiologische Effekte des potenten Vasodilators und Inhibitors der Thrombozytenaggregation PGI<sub>2</sub> wurden bis Konzentrationen von 50 pg/ml ( $\sim 10^{-10}$  M) beschrieben, wohingegen TXA<sub>2</sub> als sein physiologischer Antagonist bis zu vier Größenordnungen potenter ist. [212, 213] Die Konzentration von PGI<sub>2</sub> war während der gesamten statischen Testung annähernd konstant ( $\sim 100$  pg/ml) und vergleichbar mit der im Plasma von gesunden Spendern nachgewiesenen Menge. [214, 215] Im Gegensatz dazu war die TXA<sub>2</sub>-Konzentration in den Proben mit 2 - 7 pg/ml etwa zehnfach geringer als die *in vivo* Plasmakonzentration von gesunden Spendern [215, 216] und zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen PEI und der Referenz.

Die Untersuchung der Sekretion ausgewählter pro- und anti-inflammatorisch wirkender Zytokine sowie verschiedener von aktivierten Endothelzellen sezernierter Wachstumsfaktoren erbrachte lediglich detektierbare Veränderungen in den Sekretionsprofilen der Interleukine 6 und 8. Für das pro-inflammatorische Interleukin 6 (IL-6) wurden im gesamten Zeitraum der statischen Testung aus dem Überstand der HUVEC beider untersuchten Materialien Konzentrationen zwischen 50 und 150 pg/ml detektiert. Diese Mengen stimmen mit früheren *in vitro* Studien hinsichtlich der IL-6 Sekretion ruhender humaner Endothelzellen in statischen und dynamischen Testsystemen überein. [217-219] IL-6 entfaltet keinen Einfluss auf die Zellproliferation, erhöht jedoch die Permeabilität der Endothelzellschicht durch morphologische Veränderung der Zellen (Spindelform) und bewirkt die chemotaktische Rekrutierung und Transmigration von T-Lymphozyten in Entzündungsherde. [89, 217, 220] Die wichtigste Erkenntnis aus diesem Experiment war, dass während der gesamten Zeitspanne von elf Tagen die aus dem Überstand detektierten Konzentrationen an IL-6 bei den PEI-Filmen stets signifikant geringer waren als bei TCP. Für die ersten 48 Stunden nach der Aussaat könnte die ebenfalls signifikant geringere Zelldichte auf den PEI-Filmen eine Erklärung dafür sein. Jedoch war diese in den folgenden Messungen nach sieben und elf Tagen Kultivierungszeit zwischen PEI und TCP vergleichbar. Aus diesem Grund weisen die Ergebnisse der statischen Untersuchung auf einen leichten anti-inflammatorischen Effekt hinsichtlich der IL-6 Sekretion des polymeren Materials PEI auf die HUVEC hin. Die Sekretion des pleiotrop wirkenden Interleukins 8 (IL-8) auf HUVEC äußert sich auf verschiedene Arten. Auf der einen Seite wirkt dieses Zytokin als pro-inflammatorischer Mediator zur chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe und der Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen. Auf der anderen Seite ist das gleiche Zytokin ein die Angiogenese induzierender Faktor, welcher an der (Neu)Bildung von Blutgefäßen beteiligt ist. Auf HUVEC entfaltet IL-8 *in vivo* eine anti-apoptotische Wirkung, unterstützt die Proliferation und Migration und unterdrückt

die Inflammation, indem die Adhäsion von Leukozyten an aktiviertes Endothel inhibiert wird. [7, 217] Sowohl bei PEI als auch bei der Referenz waren die Mengen an IL-8 in den Überständen mit früheren *in vitro* Studien vergleichbar, in denen die IL-8 Sekretion von ruhenden humanen Endothelzellen untersucht wurde. [217, 220] Im statischen System zeigte sich in dieser Studie ein von der Zeit abhängiger Anstieg der IL-8 Konzentration, welcher unabhängig vom unterliegenden Substrat war. Für diesen Anstieg war wahrscheinlich die ebenfalls mit der Zeit zunehmende Zelldichte verantwortlich. Innerhalb der ersten sieben Tage nach der Aussaat war ein wechselnder und teils signifikanter Unterschied der IL-8 Sekretion zwischen den PEI-Filmen und TCP zu erkennen. Allerdings bewegten sich diese Änderungen stets im niedrigen pg-Bereich und ließen keine Aussagen über einen nennenswerten Einfluss des unterliegenden Materials auf das Zellverhalten zu. An dieser Stelle sei angemerkt, dass alle durch PEI vermittelten Effekte auf die Endothelzellen hinsichtlich einer Sekretion der betrachteten Mediatoren im Vergleich zu mittels IL-1 $\beta$  aktivierten Zellen marginal waren. Die sekretierten Mengen waren nach Aktivierung bei vasoaktiven Mediatoren etwa vier Mal und bei inflammatorischen Zytokinen sogar bis zu 250-fach höher.

Bei der Evaluierung der PEI-Filme hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und des Endothelialisierungspotenzials zeigte sich im statischen *in vitro* Modell, dass Endothelzellen fähig sind, mit einer Verzögerung bei der initialen Adhärenz auf diesem Substrat zu adhären und über mehrere Tage hinweg einen geschlossenen und allem Anschein nach funktionellen Monolayer auszubilden. Hierbei vermittelte das unterliegende Polymer im Vergleich zur Referenz auf die Zellen einen leichten gefäßhomöostatischen (PGI<sub>2</sub>-Sekretion) und anti-inflammatorischen Effekt (verringerte IL-6 Sekretion). Da die Funktionalität und somit Anti-thrombogenität des Endothels nur bei einem intakten, konfluenten Zelllayer gewährleistet ist, war es nicht ausreichend, die Biokompatibilität des PEI-Films *in vitro* unter rein statischen Bedingungen zu untersuchen. Entscheidend war die Stabilität der Endothelzellschicht unter der Einwirkung von Scherkräften, wie sie durch den Blutstrom im Blutgefäßsystem vorzufinden sind. Hierbei war es wichtig, die Stabilität der Zelladhärenz über einen großen Zeitraum hinweg, beginnend mit der initialen Adhärenz bis hin zur Retention der konfluenten Endothelzellschicht auf PEI zu verfolgen.

Wie in den vorherigen Untersuchungen zeigten die HUVEC bei der Vorbereitung des dynamischen *in vitro* Modells ein verzögertes Wachstum unter statischen Bedingungen und bestätigten damit die zuvor gemachten Beobachtungen. Im Vergleich zu Glas war nach acht Stunden eine initial geringere Adhärenz der HUVEC auf den PEI-Filmen erkennbar, welche beim nächsten Messzeitpunkt 40 Stunden später in einer geringeren Zelldichte resultierte. Die Gründe dafür lagen mit hoher Wahrscheinlichkeit in den bereits angesprochenen Grenzflächeneigenschaften der PEI-Filme begründet, von denen bekannt ist, mit einer verringerten Anbindung und Proliferation verschiedener Zelltypen assoziiert zu sein. [221] Die passiv adsorbierte amorphe Proteinschicht an der Polymeroberfläche störte dabei die Interaktion zwischen der unterliegenden Matrix und endothelialen Oberflächenrezeptoren, welche für die Zelladhäsion und die Ausbildung der EZM verantwortlich sind. [218, 222] Allerdings zeigte eine mit Glas vergleichbare Zelldichte nach neun Tagen die Fähigkeit der Endothelzellen, eine konfluente Zellschicht durch Generierung ihrer eigenen EZM auf den PEI-Filmen bilden zu können. [39, 221] Das Anlegen von venösen Scherkräften offenbarte eine sichtbar bessere Scherresistenz des HUVEC Monolayers auf dem polymeren Substrat, welche 48 Stunden und neun Tage nach der Aussaat signifikant wurde. Dies

war ein wenig überraschend, wenn man die initial geringere Zelldichte auf PEI in Betracht zieht. Ungeachtet dessen waren auf beiden Materialien nach der Scherung des neun Tage alten konfluenten Zelllayers zellfreie Areale zu erkennen. An diesen Stellen würde die nach wie vor leicht thrombogene Polymeroberfläche der PEI-Filme *in vivo* für die Anlagerung von Thrombozyten aus dem Blutstrom zugänglich sein und es möglicherweise zu einer Aktivierung der Plättchen und nachfolgender Gerinselbildung kommen.

Hinsichtlich der Untersuchung der Zell-Matrix Interaktionen durch Analyse des fibrillären Aktin Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionen wurden die zuvor gemachten Beobachtungen einer starken Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion unter statischen Wachstumsbedingungen bestätigt. Lediglich eine Untersuchung des acht Stunden nach der Aussaat gescherten Zelllayers war nicht möglich, da die Adhärenz der verbliebenen Zellen noch nicht ausreichend war, um das Färbeprotokoll unbeschadet zu überstehen. Im Gegensatz zu früheren wissenschaftlichen Studien [223, 224] konnte nach der Scherung weder eine Neuordnung der HUVEC Stressfasern oder die Bildung sogenannter „*circular ruffles*“ um den Zellkortex, noch eine Verstärkung der fokalen Adhäsionspunkte als Folge der Scherkräfte beobachtet werden. Unter längerer Einwirkung physiologischer Strömung verändern Endothelzellen normalerweise ihre Morphologie hin zu einer in Strömungsrichtung ausgerichteten Spindelform, welche mit den genannten intrazellulären Änderungen assoziiert ist. [193] Hierbei wirken das Zytoskelett und die fokalen Adhäsionskomplexe zusammen über Integrine als Mechanosensoren und übertragen extrazelluläre Informationen in die Zelle. [209] Als eine Anpassung an Scherkräfte werden dadurch diverse intrazelluläre Kaskaden aktiviert, welche Veränderungen der Genexpression, Proliferation und Migration regulieren. [223]

In dieser Studie zeigten nur vereinzelte Zellen die beschriebenen Änderungen ihres Zytoskeletts und der fokalen Adhäsionen, wobei diese mit einer Reduktion der zellulären Ausbreitungsfläche verbunden waren. Diese Beobachtung wurde auf den PEI-Filmen als auch der Referenz gemacht. Jedoch könnten sich diese vereinzelt Zellen ebenso in einem anderen Stadium ihres Zellzyklusses wie zum Beispiel der Zellteilung befunden haben, was ebenfalls die Verringerung der Ausbreitungsfläche erklären würde. Ein anderer Grund für die fehlende morphologische Anpassung der HUVEC an die Scherkräfte waren die Rahmenbedingungen des Experimentes. Die Auswahl mittlerer venöser Scherkräfte von 3 dyn/cm<sup>2</sup> über einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum von sechs Stunden war nicht lang genug, um die genannten Reaktionen bei den Endothelzellen zu induzieren. [193] Dennoch waren diese Bedingungen ausreichend, um Teile des zuvor funktionellen Zelllayers zu zerstören und die polymere Oberfläche freizulegen.

Die partielle Zerstörung der Endothelzellschicht wirkte sich jedoch nicht nur morphologisch sondern ebenso funktionell auf die Zellen aus. Zunächst zeigte die Quantifizierung der antagonistisch wirkenden vasoaktiven Mediatoren PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> aus dem Überstand sowohl für den statischen als auch den dynamischen Teil dieser Studie keine funktionellen Änderungen der HUVEC auf den PEI-Filmen im Vergleich zum Referenzmaterial. Die nachgewiesenen Konzentrationen waren für beide Mediatoren im physiologisch wirksamen Bereich [212, 220], wobei eine nennenswerte TXA<sub>2</sub> Sekretion lediglich unter Einwirkung von Scherkräften ermittelt wurde. Die Sekretion des Vasodilators PGI<sub>2</sub> war unter dynamischen Bedingungen initial erhöht, stabilisierte

sich jedoch ungeachtet der steigenden Zelldichte 48 Stunden nach der Aussaat. Dieses Verhalten des HUVEC Monolayers in einer laminaren Strömung ist bekannt und die erhöhte Sekretion von PGI<sub>2</sub> wirkt hierbei *in vivo* der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten entgegen. [225, 226] Unter gleichen Bedingungen wurde ein durch den Scherstress induzierter bis zu fünffacher Anstieg der TXA<sub>2</sub> Konzentration im Überstand der PEI-Filme und der Referenz detektiert. Dieser Anstieg resultierte mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der partiellen Zerstörung des HUVEC Monolayers während der Scherung, wobei Zellen geschädigt wurden und Teile des unterliegenden Polymers frei lagen. Beides besitzt Ähnlichkeit mit einer Verletzung des Blutgefäßes und resultiert in der vermehrten Ausschüttung von TXA<sub>2</sub>.

Auch hinsichtlich der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und -8 wurden die zuvor unter statischen Bedingungen erhobenen Resultate bestätigt. Die Konzentrationen von IL-6 und -8 der korrespondierenden IL-1 $\beta$  aktivierten Positivkontrollen bewegten sich je nach Zeitpunkt nach der Aussaat zwischen 3 und 60 ng/ml. Demnach waren die Unterschiede in der Sekretion zwischen beiden Materialien im pg-Bereich für beide untersuchten Mediatoren marginal. Abgesehen von den geringen Konzentrationsunterschieden konnte dennoch ein signifikanter Scherstress induzierter Anstieg der IL-6 Sekretion der HUVEC auf beiden Materialien neun Tage nach der Aussaat nachgewiesen werden. Dieses Resultat stimmt mit früheren *in vitro* Studien hinsichtlich der IL-6 Sekretion von ruhenden humanen Endothelzellen im dynamischen System überein. [217, 219] *In vivo* werden durch niedrige Scherkräfte das Voranschreiten von Arteriosklerose und *in vitro* inflammatorische Zellreaktionen unterstützt, was Hand in Hand mit einer erhöhten IL-6 Freisetzung geht. [227, 228]

Die Ergebnisse der dynamischen Studie zeigten, dass der unter statischen Wachstumsbedingungen auf PEI-Filmen funktionelle Endothelzelllayer zwar eine mit dem Referenzmaterial vergleichbare, jedoch nicht ausreichende Retention gegenüber physiologischen Scherkräften besaß. Die partielle Ruptuierung des Endothelzellmonolayers machte hierbei nicht nur Teile der Polymeroberfläche für die potenzielle Adhäsion von Thrombozyten zugänglich, sondern induzierte auch eine natürliche inflammatorische und vasokonstriktive Antwort des beschädigten Endothels.

### 7.3. *In vitro* Selektion PEI-Film bindender DNS-Aptamere

Da in diesem Projekt erstmalig eine auf Nukleinsäuren basierende *in vitro* Selektion gegen die Oberfläche eines Polymers durchgeführt wurde, war nicht klar, ob im Rahmen der SELEX eine Anreicherung bindender Aptamere stattfinden würde. Planare Oberflächen unterscheiden sich maßgeblich von niedermolekularen Zielmolekülen wie z.B. Proteinen, welche sich in der gleichen Größenordnung wie Aptamere bewegen. Bei der Selektion gegen Homopolymere wie PEI spielt demnach möglicherweise nicht nur die molekulare Architektur sondern ebenso die makroskopische Oberfläche hinsichtlich Ladungsverteilung, Elektronendichte oder Hydratisierung eine maßgebliche Rolle für die Interaktion mit DNS.

Bereits während der ersten fünf Selektionsrunden gegen die Oberfläche der PEI-Filme war eine Anreicherung bindender Sequenzen anhand der erhöhten Materialbindung im Vergleich zur Ausgangsbibliothek zu erkennen. Durch die Einführung der Gegenselektion gegen im biotechnologischen und medizinischen Sektor verwendete Polymere (PS, PEVA) mit ähnlichen Ober-



flächeneigenschaften hinsichtlich Benetzbarkeit, Oberflächenpotenzial und bezüglich PS auch der Topographie kam es erwartungsgemäß in den beiden Folgerunden zu einem Absinken der nachgewiesenen Materialbindung. Dies war ein Indiz für die Eliminierung von Sequenzen aus der bereits angereicherten Nukleinsäurebibliothek, welche allem Anschein nach unselektiv für PEI-Filme waren. Der trotz steigender Stringenz der Selektionsbedingungen erneute quantitative Anstieg der Bindung an PEI ab der Selektionsrunde acht belegte die Anreicherung PEI bindender Sequenzen bis zur Runde elf. Die nachgewiesene Menge an DNS von etwa 4 pmol auf einem PEI-Film von 6 mm Durchmesser entsprach, unter Annahme einer hexagonalen Gleichverteilung der Nukleinsäuren auf der Polymeroberfläche einer Aptamerdichte von rund  $4 \cdot 10^4$  Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  und somit einer annähernden Sättigung, der Oberfläche mit DNS. Jedoch ließ sowohl die Quantifizierung der PEI gebundenen Aptamere mittels RealTime PCR als auch der Nachweis eines makroskopisch verbesserten Benetzungsverhaltens und die Veränderung in der Komposition der Oberflächenenergie nach der Bindung von ssDNS am Polymerfilm mit Hilfe der Kontaktwinkelmessungen keine Aussage über die Verteilung der Aptamere auf dem PEI-Film zu. Die Visualisierung der AlexaFlour647 modifizierten PEI bindenden Aptamere mit dem Laser-Raster-Mikroskop zeigte erstmals eine flächendeckende Aptamerbindung auf der Polymeroberfläche, welche essentiell für eine spätere effektive nicht-kovalente Oberflächenfunktionalisierung mit zellbindenden Liganden ist. Dennoch ist zu beachten, dass die laterale Auflösungsgrenze dieser optischen Methode, unter Berücksichtigung der Wellenlänge und der numerischen Apertur des Objektivs, etwa die Hälfte der verwendeten Wellenlänge betrug. Bei dem AlexaFlour647 Fluoreszenzfarbstoff ( $\text{ex/em} = 650/668 \text{ nm}$ ) lag diese bei  $\sim 300 \text{ nm}$ . [229] Gebundene Aptamere oder auch Aggregate selbiger kleiner als 300 nm wären mit dieser Methode nicht mehr getrennt voneinander detektierbar.

Beim Nachweis der flächendeckenden Aptamerbindung mit optischen Methoden waren erneut die bereits zuvor mittels AFM detektierten sternförmigen Kavitäten auf der PEI-Oberfläche erkennbar. Diese Strukturen zeigten kein Fluoreszenzsignal der DNS und wiesen damit auf ein Fehlen von Aptameren in diesen Bereichen hin. Der Grund für die Abwesenheit einer Bindung war, wie bereits angesprochen, aller Voraussicht nach eine unzureichende Benetzung mit dem polaren Lösungsmittel. Anhand der Grenzflächencharakterisierung hatte sich gezeigt, dass die PEI-Oberfläche einen ausgeprägt hydrophoben Charakter besitzt und von aromatischen Gruppen dominiert wird. An solchen Kontaktflächen können sich, besonders in Verbindung mit Kavitäten, durch die Oberflächenspannung der wässrigen Phase mikroskopisch kleine Blasen bilden, welche eine Interaktion des Lösungsmittels und somit der Aptamere mit der Polymeroberfläche verhindern. [230] Bei genauer Betrachtung waren die erkennbaren Strukturen auf PEI, welches mit der Startbibliothek behandelt wurde, deutlich ausgeprägter und zeigten eine größere Ausdehnung von  $\sim 100 \mu\text{m}$  Durchmesser. Unter Verwendung der angereicherten PEI bindenden Aptamere waren sie deutlich kleiner ( $\text{Ø} = \sim 20 \mu\text{m}$ ) und wiesen eine definiertere Morphologie auf. Diese Beobachtung kann durch die spezifischere Interaktion angereicherter Aptamere mit der Polymeroberfläche erklärt werden. Die Hintergrundbindung der Startbibliothek war unspezifischer, so dass die Zugänglichkeit der PEI-Oberfläche an den Kavitäten und damit deren Benetzung durch Verdrängung der Mikroblasen an der Phasengrenze zwischen Polymer, Lösungsmittel und Luft für die DNS-Moleküle erschwert war.

Eine Fragestellung bei der Durchführung dieses Projektes war ebenso, ob die Generierung materialesektiv bindender Aptamere gegen das gewählte Polymer möglich ist. Wie bereits angesprochen, erlaubt es die Methodik der *in vitro* Selektion prinzipiell hochaffine und selektiv bindende Aptamere gegen jegliche Zielstruktur zu isolieren. Hierbei sind die einzigartigen durch eine Vielzahl nicht-kovalenter Kräfte vermittelten, multivalenten Interaktionen zwischen dem gefalteten Aptamer und seinem Zielmolekül entscheidend. [95, 231] Bei den vergleichenden Bindungstests mit PEI, PS und PEVA stellte sich jedoch heraus, dass trotz Gegenselektion keine Selektivität der angereicherten Aptamere für die PEI-Oberfläche vorhanden war. Die angereicherten Aptamere zeigten eine erhöhte Affinität zu allen drei getesteten Polymeren. Dieses Ergebnis widersprach jedoch dem Prinzip der Gegenselektion, bei der durch den Überschuss nicht selektionsrelevanter Moleküle unselektiv bindende Sequenzen hätten aus der Bibliothek eliminiert werden müssen. Es sind zwei mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse denkbar. Entweder war die Gegenselektion schlicht nicht stringent genug, um alle unselektiv bindenden Aptamere zu beseitigen oder das Pyrimidin-dominierte Sequenzmotives wurde bereits innerhalb der ersten Selektionszyklen (ohne Gegenselektion mit PS und PEVA) aufgrund seiner Bindungseigenschaften sehr prominent in der kombinatorischen Bibliothek vertreten, so dass Varianten davon trotz Gegenselektion während des weiteren SELEX Prozesses weiter angereichert wurden.

### 7.4. Analyse des PEI-Film bindenden Aptamermotives

Genauen Aufschluss über die Komposition der angereicherten Nukleinsäurebibliothek und damit die Affinität angereicherter Aptamere an alle verwendeten Polymere gab die Sequenzierung und Analyse der Primärstruktur. Hier stellte sich heraus, dass die angereicherte Bibliothek nach wie vor aus vielen unterschiedlichen Sequenzmotiven bestand und die Anreicherungen der zehn am häufigsten vorkommenden Motive des randomisierten Bereiches lediglich im Bereich von 8,5 - 1% lagen. Bei erfolgreichen *in vitro* Selektionen gegen diverse biologische Zielstrukturen (meist globuläre Proteine oder Peptide) wurden in der Vergangenheit in der Selektionsbibliothek Anreicherungen einzelner Aptamerfraktionen von 30% und mehr erreicht. [136, 232] Jedoch zeigte sich bei näherer Betrachtung der PEI bindenden Liganden, dass abgesehen von der reinen Basensequenz, welche für die Zuordnung zu den einzelnen Fraktionen ausschlaggebend war, alle betrachteten Aptamere den gleichen Grundaufbau in ihrer Primärstruktur zeigten. Ausnahmslos bestand der Zufallsbereich aus einer zentralen Pyrimidin-reichen Sequenz mit einer Präferenz für Thymin, welche von ausgeprägten GC-reichen Sequenzbereichen flankiert wurde. Demnach war dieses Bindungsmotiv in den analysierten Sequenzen der Bibliothek dominierend und es scheint, als wären Pyrimidine und dabei speziell Thymin essentiell für die beobachtete Bindung an die PEI-Oberfläche. Die Möglichkeit, dass dieses Pyrimidinbindungsmotiv einzig auf der Anreicherung von PCR-Artefakten beruht, welche sich stets durch die Verwendung dieser speziellen DNS-Startbibliothek anreichern würden, konnte durch den Vergleich mit einem anderen SELEX Experiment gegen eine zelluläre Zielstruktur ausgeschlossen werden. Es ist wahrscheinlicher, dass die physikalisch-chemischen Grenzflächeneigenschaften des Polymers bestimmte Basen bzw. Basenabfolgen über attraktive Wechselwirkungen und Erhöhung der Entropie eher dazu befähigten in die unmittelbare Nähe seiner Oberfläche zu gelangen und erst dort über eine Vielzahl unterschiedlicher nicht-kovalenter Kräfte mit ihr zu interagieren. Hierbei scheint die

Interaktion von PEI mit Pyrimidinen und speziell Thymin im Bindungsmotiv bevorzugt zu sein. Die Simulation der zweidimensionalen Sekundärstrukturen ergab für die näher betrachteten Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4 eine vergleichbare Faltung der Sequenzen. Der poly-Pyrimidin-Bereich formte stets eine exponierte ringförmige Struktur, welche keine weiteren intramolekularen Interaktionen aufwies und demnach frei mit der Polymeroberfläche oder anderen Molekülen in Kontakt treten konnte. Diese Faltung wurde, abgesehen von der thermisch instabilen Struktur des PEI-1, stets von einem doppelsträngigen GC-reichen Stammbereich stabilisiert. (vgl. Abbildung 41 und 42) Die klare Trennung der Primersequenzen von diesem uniformen Bindungsmotiv beweist hierbei eine selektionsbedingte Anreicherung dieser Aptamerfraktionen.

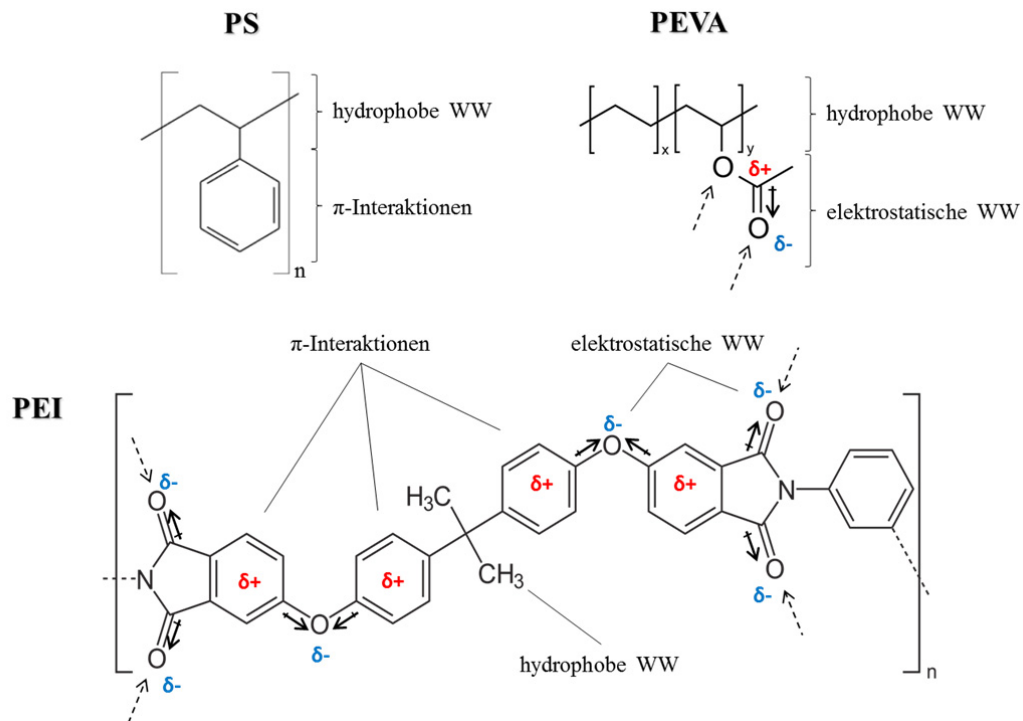
Von den faltungsbedingten Betrachtungen abgesehen, scheint es als wären bei allen Bindungsmotiven Pyrimidine und im Speziellen die Base Thymin von entscheidender Bedeutung für die Annäherung und Bindung der Aptamere an die Polymeroberfläche. Auf anderem Weg sind das hohe Vorkommen und die exponierte Position nicht zu erklären. An dieser Stelle muss intensiv diskutiert werden, wie die Bindung zwischen den Aptameren und der Polymeroberfläche zustande kommt und warum die Interaktion mit Pyrimidinen bzw. Thymin an der Grenzfläche im Vergleich zu Purinen bevorzugt ist. Erinnert man sich an die physiko-chemische Charakterisierung der PEI-Film Oberfläche, so wies diese eine geringe Benetzbarkeit und eine leicht negative Nettoladung bei physiologischem pH auf. Um sich ein Bild von der rein physikalischen Aptamerbindung zu machen, ist es wichtig zu wissen, dass intermolekulare physikalische Interaktionen stets durch ein Zusammenspiel verschiedener Kräfte vermittelt werden. Diese sind, abhängig von den Interaktionspartnern und -bedingungen, mehr oder weniger stark an dieser Interaktion beteiligt, können jedoch auch entgegengerichtet wirken. Zu den bei einer Wechselwirkung zwischen Molekülen wirkenden Kräften gehören in erster Linie die in der Einleitung beschriebenen "schwachen" Interaktionen sowie Solvatisierungseffekte in Verbindung mit ionischen WW enthaltener Metalle. [156] Das verwendete Polymer als auch DNS-Basen weisen eine ausgesprochen hydrophobe Natur auf und sind daher bestrebt, den energetisch ungünstigen Kontakt mit dem umgebenden polaren Lösungsmittel zu vermeiden. Kationen im Puffersystem besitzen hierbei eine vermittelnde und koordinative Funktion, indem sie die Polarisierung der Materialoberfläche erhöhen und die negative Ladung des DNS-Rückgrats neutralisieren. Aufgrund der Hydrophobizität der Basen sind die Aptamere bestrebt, diese vom Lösungsmittel abzuschirmen und dabei ebenfalls die Entropie zu maximieren. Um dies zu erreichen, gibt es für die Aptamere zwei Möglichkeiten. Die Bildung von Aggregaten oder der Kontakt mit der ebenfalls hydrophoben Polymeroberfläche, wobei in beiden Fällen das negativ geladene DNS-Rückgrat in Richtung der wässrigen Phase ausgerichtet wird. Ebenso wirken vornehmlich divalente Metallionen unterstützend, weil sie die Coulombrepulsion zwischen den Molekülen verringern und die Assoziation zwischen Aptamer und Polymeroberfläche über langreichweitige elektrostatische WW erleichtern.

Die Maximierung der Entropie durch Verringerung der hydrophoben Kontaktflächen bei der Assoziation hydrophober Nukleotidbasen mit der durch aromatische Systeme dominierten Polymeroberfläche als auch die vornehmlich durch divalente Kationen verringerte Coulombrepulsion im Zusammenspiel mit attraktiven elektrostatischen WW zwischen Phosphatrückgrat, Metallionen und partiell negativ geladenen Funktionalitäten der Polymeroberfläche sind die initialen treibenden Kräfte für die Rekrutierung der Oligonukleotide an PEI. (vgl. Abbildung 6) Die

Abhängigkeit der Aptamerbindung von divalenten Metallionen wurde in entsprechenden Bindungsstudien bewiesen. Ohne die Präsenz von Metallen in der wässrigen Phase war keine Assoziation der Aptamere mit der Polymeroberfläche nachweisbar und durch alleinige Zugabe monovalenter Metallionen war die Bindung um den Faktor 70 verringert.

Um nun die Präferenz von Pyrimidinen bei der Polymerbindung zu verstehen, ist eine genaue Betrachtung der Nukleotidbasen als auch der Kräfte nötig, welche in unmittelbarer Nähe zur Polymeroberfläche zu einer Interaktion beitragen können. Generell handelt es sich bei den Nukleotidbasen um polarisierte, aromatische Heterozyklen. [233] Purine weisen durch die Ladungsverteilung in ihrem Ringsystem ausgeprägte nukleophile Eigenschaften auf und besitzen ein ausgedehntes negatives Potenzial. Pyrimidine hingegen zeigen durch ihre Heteroatome eine molekulare Ladungsverteilung mit Regionen hoher positiver und negativer Ladungsverteilung und bilden dadurch einen Dipol. [100, 156] Demnach sind Pyrimidine bei direkter Interaktion mit partiell negativ geladenen Funktionalitäten oder  $\pi$ -Elektronenwolken aromatischer Systeme an einer Polymeroberfläche im Vergleich zu Purinen bevorzugt, da die ladungsbedingte Repulsion verringert ist. [156] Bei Purinen wird die Repulsion zusätzlich durch die doppelte Anzahl von Stickstoffatomen im Ringsystem und einer damit verbundenen erhöhten Elektronendichte verstärkt. Allgemein wird die Repulsion durch elektronendefiziente Atome verringert und durch elektronenreiche verstärkt. [99] Betrachtet man nun Thymin, fallen einige Besonderheiten auf, welche sich vorteilhaft auf die Interaktion mit der PEI in unmittelbarer Nähe zu seiner Oberfläche auswirken. Anders als die anderen drei Nukleotidbasen besitzt Thymin keine primäre Aminogruppe. Dafür ist das Pyrimidinringsystem mit zwei Sauerstoffatomen und einer außerhalb der Ebene liegenden Methylgruppe substituiert. In aromatischen Systemen bzw. allgemein Strukturen mit einem delokalisierten  $\pi$ -System wirken  $-NH_2$  Substituenten durch einen (+M)-Effekt elektronenschiebend, wobei sie die Ladungsdichte in der  $\pi$ -Elektronenwolke erhöhen. Exozyklische Sauerstoffe weisen hingegen einen gegenteiligen (-M)-Effekt auf, indem sie Elektronendichte aus dem aromatischen System abziehen. Aus diesem Grund wird der Heterozyklus des Thymins positiver, was in einer erhöhten Attraktivität für Atom-Atom und Atom- $\pi$ -Interaktionen resultiert. [156] Darüber hinaus verringert sich durch die reduzierte  $\pi$ -Elektronendichte die elektrostatische Repulsion von Thymin im Vergleich zu den anderen Nukleotidbasen hinsichtlich einer Interaktion mit anderen delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystemen oder Molekülen/Oberflächen mit leicht negativem Oberflächenpotenzial. [234, 235] Letztlich ist Thymin durch die exozyklische Methylgruppe im Vergleich zu den anderen Basen hydrophober, was zusätzlich die Interaktion mit der PEI-Oberfläche über hydrophobe Wechselwirkungen unterstützt und ebenso entropisch begünstigt ist. Dabei wurde durch die Aneinanderreihung von Thyminen eine regelrechte hydrophobe Domäne mit geringerer Repulsion geschaffen. [236, 237] Alle angesprochenen Besonderheiten verdeutlichen, warum Pyrimidine und dabei speziell Thymin im Bindungsmotiv der angereicherten Aptamere bevorzugt selektiert wurde, aber auch warum keine Materialselektivität vorhanden war. Die in der betreffenden Bindungsstudie verwendeten Polymere (PEI, PS und PEVA) wiesen mit einer geringen Benetzbarkeit und einem leicht negativen Nettooberflächenpotenzial trotz einer gänzlich verschiedenen chemischen Zusammensetzung und demnach unterschiedlichen Möglichkeiten für Interaktionen mit Nukleinsäurebasen, sehr ähnliche makroskopische Oberflächeneigenschaften auf, welche für die entropisch und ionenvermittelte

initiale Rekrutierung entscheidend waren. (vgl. Abbildung 52 und Anhang 10.2.) Betrachtet man die chemischen Strukturen der Polymere, so wird deutlich, dass PS beispielsweise nur fähig ist über hydrophobe und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen mit den Nukleotidbasen in engen Kontakt zu treten. Daraus erklärt sich auch die quantitativ geringere Aptamerbindung an PS, da hier die ionisch vermittelten attraktiven Kräfte bei der Assoziation der Aptamere über größere Entfernungen deutlich geringer sind. PEVA hingegen besitzt keine delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme, kann jedoch über seine Estergruppe sehr gut elektrostatische Interaktionen wie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und H-Brücken ausbilden. Beide Beispiele belegen erneut, dass die Interaktion zwischen Polymeroberfläche und Aptameren durch ein Zusammenspiel verschiedener physikalischer Kräfte vermittelt werden muss. Aus der Struktur von Modellpolymer PEI wird ersichtlich, dass es aufgrund seines ausgeprägten aromatischen Charakters sowie der Vielzahl partiell negativ geladener funktioneller Gruppen fähig ist, über multiple physikalischer Interaktionsmechanismen mit den Nukleotidbasen in engen Kontakt zu treten. Besonders deutlich zeigte sich dies durch makroskopische Veränderungen im Benetzungsverhalten sowie der Zusammensetzung der Oberflächenenergie.



**Abbildung 52.** Interaktionsmöglichkeiten der verwendeten Polymere für nicht-kovalente WW mit Nukleinsäurebasen.

Weiteren Aufschluss hinsichtlich der Aptameraffinität zur PEI-Film Oberfläche gaben die Bindungsuntersuchungen mit den einzelnen Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4. Hierbei zeigte sich, dass die Einzelaptamere stets eine quantitativ geringere Bindung als die angereicherte Bibliothek besaßen. Ebenso zeigten sich Unterschiede im quantitativen Bindungsverhalten zwischen schwächer bindenden Kandidaten PEI-1 und -2 sowie den mit höherer Affinität bindenden Aptameren PEI-3 und -4, welche durch die angewendeten strukturellen Analysen nicht zu erklären

waren. Erst die Kombination mehrerer Aptamerkandidaten in äquimolaren Verhältnissen ließ weitere Schlussfolgerungen hinsichtlich der Materialbindung als auch der intermolekularen Interaktionen zwischen den Aptameren zu. Zum einen bestätigte sich, dass die gleichen Strukturen an der PEI-Film Oberfläche die Zielstrukturen der Aptamerkandidaten darstellen. Wäre dies nicht der Fall, hätte es durch die Mischung mehrerer Aptamerfraktionen zu einer Summation der quantitativ nachgewiesenen DNS Menge an der Polymeroberfläche kommen müssen. Sehr interessant war, dass die quantitativ nachgewiesene Materialbindung bei einer Mischung aus allen vier Aptamerkandidaten, d.h. der vergleichsweise stark und der weniger affinen Fraktionen, genau zwischen der Affinität der einzelnen Fraktionen lag. Dieses Resultat bewies die intermolekulare Interaktion der einzelnen Sequenzmotive vor der eigentlichen Annäherung an die Polymeroberfläche. Andernfalls hätte das Bindungsverhalten des äquimolaren Gemisches aus allen Aptameren mindestens dem der Mischung aus PEI-3/4 entsprochen, da alle Fraktionen stets in ausreichender Stoffmenge (5 nmol) für eine flächendeckende Sättigung im Bindungsansatz vorhanden waren. Dieses Ergebnis liefert somit auch eine mögliche Erklärung für den Nachweis größerer Aptamer Mengen an der PEI-Film Oberfläche bei Verwendung der angereicherten Bibliothek aus der Selektionsrunde elf. In dieser waren nachweislich mehr Fraktionen in ihrer Basensequenz leicht unterschiedlicher Polythyminmotive enthalten, die auf unterschiedlichste Art und Weise mit der Polymeroberfläche als auch untereinander in Interaktion treten und Aggregate formen können, was die quantitativ höhere Bindung im Vergleich zu Einzelaptameren erklären würde. Die Neigung der Oligonukleotide zur Aggregation ergibt sich aus ihrem strukturellen Aufbau und wurde mittels DLS und fluoreszenter Markierung nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass die gelösten Aptamere in ihrer Größe statistisch verteilte Aggregate bildeten, was in einer hohen Polydispersität resultierte. Die Anzahl war, beginnend mit einigen wenigen Aggregaten in der Größenordnung von  $\sim 1 \mu\text{m}$  bis hinunter zur Auflösungsgrenze der verwendeten mikroskopischen Methode invers proportional zur Größe. Gegen die Bindung einer Vielzahl großer Aptameraggregate im  $\mu\text{m}$  Bereich an die PEI-Oberfläche sprach die unveränderte Topographie im Nanometerbereich nach der Aptamerbindung. Schlussfolgernd bedeutet dies für die Aptamerbindung bzw. deren Verteilung auf dem polymeren Substrat, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keine rein monolagige Verteilung vorlag, sondern ebenso kleinere Aptameraggregate im nm Bereich unterhalb der lateralen Auflösungsgrenze der mikroskopischen Methode die PEI-Oberfläche bedeckten.

Die Bildung von Aptameraggregaten im nm Bereich muss bei der Analyse der XPS und Raman Ergebnisse ebenso berücksichtigt werden. Nach der Aptamerbehandlung zeigten sich keine Veränderungen in der chemischen Oberflächenzusammensetzung, obwohl die verwendeten Aptamere reich an Phosphor und durch Biotinylierung ebenso an Schwefel waren. Um dies zu erklären, muss eine Abschätzung der Aptamerdichte auf dem Substrat vorgenommen werden. Unter der Annahme einer uniformen und monolagigen Verteilung gebundener DNS Moleküle, welche in gefaltetem Zustand als Kugeln mit 5 nm Durchmesser [97, 98] in hexagonaler Kreisgitterpackung (maximale Flächenbelegung) vorliegen und unter Vernachlässigung der Oberflächenrauigkeit der PEI-Filme, würde eine Sättigung der verfügbaren Oberfläche bei  $\sim 5 \cdot 10^4$  Aptameren pro  $\text{cm}^2$  erreicht sein. (vgl. 4.7.2.) Unter diesen Bedingungen und unter Berücksichtigung der Informationstiefe von Photoelektronen ( $\sim 10 \text{ nm}$ ) bei der XPS wäre der Volumenanteil der Aptamere  $\sim 30\%$ . Die Sensitivität der XPS Methode liegt, abhängig vom betrachteten Element, zwischen 0,1

- 1 at-%. [164] Die mittels qPCR aus allen durchgeführten Bindungstests nachgewiesene Aptamerdichte lag für PEI mit  $N = 52.601 \pm 13.743 \mu\text{m}^2$  ( $n = 45$ ) weit oberhalb der Nachweisgrenze der XPS und sollte somit ohne Probleme detektierbar sein. Bringt man jedoch eine Aggregation der DNS-Moleküle mit in die Betrachtung ein, so führt dies zu dramatischen Veränderungen im Verhältnis von Aptamer bedeckter und freier Polymeroberfläche. Umso größer der Aggregationsgrad, desto stärker wird das Signal vom Substrat. Hierbei wäre die Detektionsgrenze der XPS bei einer mittleren Aggregatgröße zwischen 20 - 30 DNS-Molekülen erreicht. Die Umgebungsbedingungen der XPS unterstützen hierbei zusätzlich die Bildung von Aggregaten. Da diese Methode ein Hochvakuum zwingend erforderlich macht, ist die Bildung von Trocknungsartefakten auf den Proben sehr wahrscheinlich, wobei die Oberflächenbedeckung mit Aptameren zusätzlich verringert wird. Mit der Raman Spektroskopie blieb eine weitere Methode hinsichtlich der Detektion einer Aptamerbeschichtung auf molekularer Ebene ergebnislos. Dies lässt sich, wie bei der XPS, anhand der Spezifikationen der Raman Methode erklären. Ein wichtiger Aspekt war, dass die Messungen in wässriger Umgebung durchgeführt wurden und somit die Bildung von Trocknungsartefakten ausgeschlossen werden kann. Für die Raman Spektroskopie ist es wichtig zu wissen, dass der Streuquerschnitt einzelner Moleküle äußerst klein ist ( $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$ ). Demnach werden verhältnismäßig hohe Konzentrationen bzw. Laserintensitäten benötigt, um ein Signal detektieren zu können. Aus diesem Grund ist die Aufnahme von Spektren einzelner Moleküle in der Regel nicht möglich. [238, 239] Zusätzlich ist die Informationstiefe des Lasers und damit die Signalintensität aus dem Matrixmaterial direkt von der Wellenlänge des Lasers anhängig. Für den verwendeten 533 nm Laser lag diese zwischen 300 - 700 nm. [167, 168] Unter Beachtung der o.g. Abschätzung war der Volumenanteil bindender Liganden unter diesen Bedingungen weit unterhalb von 1%, was eine Detektion von Molekülschwingungen der Aptamerbeschichtung unmöglich machte. Um einzelne Moleküle bzw. dünne Schichten nachweisen zu können, wären spezifische Raman Anwendungen wie die Oberflächen-verstärkte Raman Spektroskopie (SERS, engl.: *surface-enhanced raman spectroscopy*) nötig. Allerdings bedingen diese Methoden eine Veränderung der Substratoberfläche durch Beschichtung mit Edel- oder Halbedelmetallen (Gold, Silber etc.), was die Aptamerbindung unvorhersehbar beeinflussen würde. [238, 239]

Für die nachfolgende Immobilisierung von Endothelzell-bindenden Liganden auf den PEI-Filmen bedeuteten diese Erkenntnisse, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht wie anfangs vermutet eine monolagige Gleichverteilung der cRGD-Peptide über die gesamte PEI-Film Oberfläche geben würde. Vielmehr würde die Zellanbindung an kleineren cRGD Clustern auf dem Substrat stattfinden. Bezüglich der Verteilung von zellbindenden Liganden wie RGD-Peptiden konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass sich die räumliche Mikrostruktur der Liganden in der Größenordnung von Nano- bis Mikrometern direkt auf die Stärke der initialen Adhäsion von Endothelzellen auf Polymerfilmen auswirkt. [240-242] Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit der zellulären Ausbreitungsfläche (bei Endothelzellen  $1 - 6 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$  [210]) sowie der Ausbildung fokaler Adhäsionen von der Dichte des immobilisierten RGD-Peptids und dass sich eine Clusterisierung positiv auf die Endothelzelladhärenz auswirkt, da auch die korrespondierenden Integrine an der Zelloberfläche bei der Ausbildung von fokalen Adhäsionen größere Komplexe bilden. [243] Aus den Charakterisierungen der Aptamerbindung an PEI wird hierbei deutlich, dass sich nach dem Muster der gebundenen Aptamere zellbindende Cluster aus cRGD-Peptiden in Abstän-

den von wenigen Nanometern auf der PEI-Oberfläche formen würden. Durch die nicht-kovalente Verbindung des material- und zellbindenden Liganden mittels Biotin/Streptavidin würde zusätzlich eine Erhöhung der lokalen Dichte von cRGD erreicht werden. Da Streptavidin auf jeder Seite über zwei Bindungsstellen für Biotin verfügt und die Assoziation jeder Komponente des Aptamer unterstützten Endothelialisierungssystems schrittweise erfolgte, war ein theoretisches Verhältnis von eins zu zwei zwischen Material gebundenen Aptameren und cRGD zu erwarten.

### 7.5. Modellsystem zur Aptamer unterstützten Endothelialisierung von PEI-Filmen

Als ersten Schritt für die Etablierung des Aptamer unterstützten Endothelialisierungssystems wurde untersucht, inwieweit die Bindungsaffinität der multivalent bindenden PEI-Liganden unter Zellkulturbedingungen beeinflusst wird und ob die Aptamerbeschichtung über den Zeitraum, welchen die Zellen für eine initiale Adhärenz benötigen stabil war. (vgl. Anhang 10.5.1.) Für den Aufbau des Systems wurde hierbei nicht eine der einzelnen Aptamerfraktionen PEI-1 bis -4, sondern die angereicherte Nukleinsäurebibliothek mit den multiplen poly-Thymin Bindungsmotiven ausgewählt. Der Grund für diese Entscheidung war, dass für die grundlegende Überprüfung der Funktionalität einer nicht-kovalenten Immobilisierung eines niedermolekularen, zellbindenden Liganden eine maximale Interaktion zwischen der PEI-Oberfläche und den Endothelzellen ermöglicht werden sollte. Durch die größere Menge an PEI gebundenen Aptameren war eine höhere Interaktion mit Streptavidinen und gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl zellbindender Liganden möglich. Dies vermittelte einen zusätzlich stabilisierenden Effekt auf das gesamte System und maximierte die Wahrscheinlichkeit einen makroskopischen Effekt auf die Zelladhärenz nachzuweisen.

Es zeigte sich, dass die Aptamerbindung unter Standardselektionsbedingungen in Selektionspuffer bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 20 h stabil war. Innerhalb dieses Zeitraumes gab es keinerlei Anzeichen für eine Degradation der Aptamere. In nachfolgenden Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass die Aptamerbindung an das Substrat unter Zellkulturbedingungen vergleichsweise schnell verloren ging. Bereits nach kurzer Zeit wurden die Aptamere von bestimmten Bestandteilen des Zellkulturmediums von der PEI Oberfläche verdrängt und dissoziierten weitgehend intakt ins überstehende Medium. Bei entsprechenden Bindungsstudien stellte sich heraus, dass nicht das Basalmedium EBM-2, sondern lediglich einzelne und ausnahmslos proteinogene Zusatzstoffe des Vollmediums EGM-2 einen interferierenden Einfluss auf die Materialbindung der Aptamere entfalteten. Hierzu zählten das hinzugegebene fetale Kälberserum und der Wachstumsfaktor FGF, welche die Aptamerbindung annähernd vollständig eliminierten sowie VEGF und IGF, welche einen leichten interferierenden Einfluss besaßen. Der Bindungsverlust der Aptamere lag dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer konzentrationsbedingten Verdrängung durch die zugegebenen Proteine begründet. Wie zuvor beschrieben, adsorbieren hydrophobe Oberflächen Proteine aus biologischen Fluiden. [26, 28] Im EGM-2 Vollmedium waren Proteine aus dem FBS sowie FGF in weit höheren Konzentrationen als die anderen proteinogenen Zusätze enthalten. Demgegenüber stand eine vergleichsweise geringe Menge niedermolekularer Aptamere auf der polymeren Oberfläche. Somit fand an der PEI Oberfläche eine mit dem "Vroman effect" bei der Proteinadsorption vergleichbare Verdrängung der gebundenen Aptamere durch Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten adsorbierter Proteine statt. [96]



Durch die Eliminierung der interferierenden Komponenten aus dem Vollmedium konnte die Aptamerbindung auf dem PEI-Film erhalten werden, jedoch waren die HUVEC in diesem „Mangelmedium“ (EBM-2 K1) nicht fähig für längere Zeit zu adhären. Demnach verhielten sich das Aptamer- und das Zellkultursystem konträr zueinander. In einem System war eine ausgeprägte und stabile Bindung zwischen Aptamer und polymerer Matrix vorhanden, jedoch zeigten die Endothelzellen eine stark verminderte Adhärenz und Proliferation im Vergleich zum Vollmedium. Im anderen System war annähernd keine Aptamerbindung mehr an der Polymeroberfläche nachweisbar, jedoch eignete sich dieses sehr viel besser für das Wachstum der Zellen. Nichts desto trotz schlossen diese Erkenntnisse einen sichtbaren makroskopischen Effekt bei der Anwendung der Aptamer unterstützten Endothelialisierung nicht vollends aus, da selbst im Vollmedium eine im Vergleich zur Ausgangsbibliothek bedeutend größere Menge an Aptameren auf der PEI-Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Daher wurde entschieden, sowohl das Standard Zellkultursystem (EGM-2 Vollmedium) als auch das EBM-2 K1 System mit nachweislich stabiler Aptamerbindung am Polymer in nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich einer verbesserten initialen Adhärenz der Endothelzellen durch nicht-kovalente Immobilisierung von cRGD im Vergleich zum unbehandelten PEI-Film zu untersuchen.

Der Aufbau des Aptamer basierten Endothelialisierungssystems bestehend aus über Biotin/Streptavidin Interaktionen nicht-kovalent gekoppelten PEI-Film bindenden Aptameren und einem zyklischen RGD-Peptid (als zellbindende Komponente) wurde Schicht für Schicht aufeinander aufbauend auf das Polymer aufgetragen und dabei jeder einzelne Arbeitsschritt validiert. RGD als im EZM-Matrixprotein Fibronectin enthaltenes Adhäsionspeptid bindet im nativen Umfeld Integrine auf der Zelloberfläche. In der Vergangenheit konnte mehrfach gezeigt werden, dass dieses Peptidmotiv das Wachstum einer Vielzahl adhärenter Zelltypen wie zum Beispiel Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen unterstützt. [244] Hierbei wird auf der artifizialen Oberfläche das natürliche Umfeld der Zellen durch Imitierung der EZM nachgeahmt. Die Bindung an Integrine aktiviert dabei eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege, welche unter anderem die Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflussen. [64, 245] Die Entscheidung für die zyklische Variante des RGD-Peptids lag in der höheren Stabilität dieser Peptidform im Vergleich zur linearen Form begründet. [246] Darüber hinaus besitzen Endothelzellen eine größere Affinität zur zyklischen Variante des Peptids, welche vermutlich durch eine nativere Konformation hervorgerufen wird. [64] In verschiedenen Studien wurde jedoch auch gezeigt, dass RGD-Peptide einen Effekt auf die Aktivität von Thrombozyten entfalten. Die Meinungen darüber sind jedoch konträr. Auf der einen Seite wurde eine erhöhte Anlagerung von Thrombozyten an RGD-funktionalisierte Polymeroberflächen nachgewiesen, was *in vivo* zu einer Thrombose am Implantat führen kann. [64] Diese Reaktion erscheint logisch, da die Exposition von RGD als Bestandteil der EZM mit einer Läsion der Endothelzellschicht zu vergleichen ist, welche eine natürliche Koagulationsreaktion der Thrombozyten induziert. Auf der anderen Seite wirken einige zyklische RGD-Peptide als selektive Antagonisten des Thrombozytenintegrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und inhibieren die Plättchen vermittelte Thrombusformierung. [245] Für die *in vitro* Validierung der Funktionalität der Aptamer-RGD-basierten Beschichtung war dies jedoch nicht von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren bestand dank des modularen Aufbaus jederzeit die Möglichkeit, eine bindende Komponente gegen

eine andere auszutauschen. Dies galt sowohl für den zellbindenden als auch für den materialbindenden Liganden.

Im ersten Schritt zeigte sich, dass eine Modifizierung der Aptamere mit Biotin am 5'-Terminus keine Auswirkungen auf die Bindungsaffinität an die PEI-Film Oberfläche hatte. Bei der Überprüfung, ob das Biotin an den Aptameren für Streptavidin zugänglich war, stellte sich erneut heraus, wie leicht die Aptamerbeschichtung von der polymeren Oberfläche verdrängt werden kann. Das erste getestete Streptavidin enthielt BSA (1 wt-%) in seinem Puffersystem, was dazu führte, dass die Aptamerbindung bei Verwendung äquimolarer Mengen des Streptavidins im Vergleich zu den Aptameren für die Beschichtung annähernd komplett verdrängt wurde. Dieser inhibierende Effekt war direkt von der Konzentration der zugegebenen Streptavidinlösung abhängig. Den analytischen Beweis, dass nicht Streptavidin selbst durch unspezifische Adsorption an eine inhibierende Wirkung auf die Aptamere entfaltet, lieferte die Verwendung des gleichen Proteins, wobei das Streptavidin in reiner Form in einem PBS - Puffer ohne Zusätze vorlag. Mit diesem reinen Streptavidin wurde mittels Phycoerythrin (PE) Fluoreszenzmarkierung der visuelle Nachweis erbracht, dass das Biotin der bereits an den PEI-Film gebundenen Aptamere zugänglich war. Ebenso wurde bewiesen, dass Streptavidin nach der Immobilisierung von Aptameren nicht bzw. nur zu einem sehr geringen Maß unspezifisch an die PEI-Oberfläche adsorbiert, da ansonsten ebenfalls die Aptamerbeschichtung von der Matrix verdrängt worden wäre.

Im letzten Schritt beim Aufbau und Nachweis der Funktionalität des Endothelialisierungssystems musste unter Beweis gestellt werden, dass das bereits gebundene Streptavidin fähig war, weitere biotinylierte Moleküle wie den zellbindenden RGD-Liganden zu binden. Ein direkter Nachweis des biotinylierten cRGD-Peptids war nicht möglich, da für dieses Peptid kein Epitop basiertes Reportersystem existiert und ein quantitativer Proteinnachweis sowie analytische Methoden wie XPS, Raman Spektroskopie und Tropfenkonturanalyse aus bereits genannten Gründen bei Weitem nicht sensibel genug waren, um wenige pmol des Peptides an der Polymeroberfläche vor dem Hintergrund einer bereits erfolgten Streptavidinbindung zu detektieren. Somit wurde die Zugänglichkeit des an der PEI-Oberfläche gebundenen Streptavidins auf einem indirekten Weg durch eine doppelsträngige DNS-Sonde nachgewiesen, welche sowohl eine 5'-Biotin- als auch eine 5'-AlexaFluor647-Modifizierung am Gegenstrang trug. Mit dieser doppelt modifizierten Sonde konnte die Zugänglichkeit des gebundenen Streptavidins für das biotinylierte cRGD-Peptid nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich beim unbehandelten und dem mit der Startbibliothek inkubierten PEI-Film, in Kombination mit Streptavidin ein im Vergleich zum reinen Polymer leicht erhöhtes Fluoreszenzsignal der dsDNS-Sonde. Es ist somit anzunehmen, dass an dieser Stelle sowohl Streptavidin als auch die Sonde selbst zu einem geringen Teil unspezifisch an die polymere Oberfläche adsorbiert haben. Demgegenüber war das detektierte Fluoreszenzsignal der Sonde auf PEI-Filmen nach der Aptamerbindung und Zugabe von SA<sub>v</sub> deutlich stärker. Wurde das Streptavidin nicht mit hinzugegeben, so war auch kein verstärktes Signal der zweiten biotinylierten Komponente detektierbar.

Zur Validierung der Funktionalität des Aptamer unterstützten Endothelialisierungssystems nach der nicht-kovalenten Immobilisierung eines zellbindenden Liganden wurden die HUVEC zunächst im statischen Wachstum in beiden o.g. Zellkultursystemen auf nativem und Aptamer-cRGD

funktionalisiertem PEI-Film im Vergleich zu TCP als Referenz angesiedelt. Hierbei wurde die Analyse bewusst nach einer verhältnismäßig kurzen Inkubationszeit von acht Stunden durchgeführt, da das Augenmerk auf einer Verbesserung der initialen Adhärenz der Zellen lag. Diese kurze Wachstumszeit stellte jedoch kein Problem dar, da Endothelzellen *in vitro* bereits innerhalb weniger Stunden adhären sind. Dies gilt besonders in Verbindung mit einer RGD-Beschichtung der polymeren Oberfläche. [247] Unter statischen Wachstumsbedingungen wurde durch das Aptamer-cRGD System die initiale Adhärenz der HUVEC in beiden untersuchten Zellkultursystemen im Vergleich zum unbehandelten PEI-Film signifikant verbessert. Dies äußerte sich sowohl in der Anzahl ausgebreiteter Zellen als auch der Gesamtanzahl adhärenter Zellen auf PEI. Bei der Verwendung von EGM-2 Vollmedium war diese nicht so stark ausgeprägt wie im EBM-2 K1 Zellkultursystem. Diese Beobachtung geht damit konform, dass die Aptamerbeschichtung im Vollmedium nachweislich weniger stabil war und somit nur ein Bruchteil der unterstützenden Ligandenbeschichtung auf PEI für die Interaktion zur Verfügung stand. Der Umstand, dass die Endothelzellen im EBM-2 K1 gegenüber dem EGM-2 Zellkultursystem ein erheblich verbessertes Adhärenzverhalten zeigten, beweist an dieser Stelle die Funktionalität der Aptamer-cRGD Beschichtung und das nicht möglicherweise unspezifisch an das hydrophobe Polymer adsorbiertes Streptavidin bzw. cRGD dafür verantwortlich war. In diesem Fall wäre in beiden Mediumkompositionen ein vergleichbares Zellverhalten beobachtet worden.

Nach dem Nachweis einer signifikant verbesserten initialen Endothelzelladhärenz unter statischen *in vitro* Bedingungen wurde nachfolgend der Frage der initialen Scherresistenz der Endothelzellen nachgegangen. Hierbei zeigte sich erneut, dass die HUVEC im EBM-2 K1 Kultursystem nicht fähig waren, in der kurzen Aussaatzeit einen weitgehend geschlossenen Zelllayer zu formen. Dennoch waren die Zelldichten vor dem Anlegen von Scherkräften auf allen getesteten Proben mit denen des statischen Systems vergleichbar. Morphologisch bildeten die adhärenen Zellen auf dem Aptamer-cRGD funktionalisierten PEI-Film sowie auf dem Referenzmaterial Zellcluster und zeigten eine ausgeprägte Spindelform. Dieses Erscheinungsbild der HUVEC unterstrich erneut, wie sich das EBM-2 K1 Zellkultursystem durch das Fehlen von Serum sowie bestimmter Wachstumsfaktoren nachteilig auf die Zellen auswirkte. Genau aus diesem Grund war das angepasste Zellkultursystem gut geeignet, um den durch das Aptamer-cRGD System vermittelten positiven Effekt auf die initiale Adhärenz der Zellen im Vergleich zu unbehandeltem PEI-Film makroskopisch sichtbar zu machen. Während auf dem unbehandelten PEI-Film lediglich vereinzelt ausgebreitete Endothelzellen zu erkennen waren, adhärten auf dem funktionalisierten PEI etwa dreimal so viele HUVEC. Auch nach der zweistündigen Inkubation des Zelllayers unter laminarer Strömung verblieb auf dem Aptamer-cRGD funktionalisierten Polymer eine etwa dreifach höhere Zellzahl, welche mit der auf der Referenz vergleichbar war. Eine vollständige Scherresistenz der adhärenen Zellen konnte jedoch auch durch die Funktionalisierung nicht erreicht werden und es wurden unabhängig vom Material etwa ein Viertel der Zellen abgelöst. Dieses Ergebnis war nach der kurzen Aussaatzeit zu erwarten, da die initiale Adhäsion der Endothelzellen auf der PEI Oberfläche nach wie vor von der natürlichen Interaktion der membranständigen Integrine mit dem RGD-Liganden abhängig war. Für eine weitergehende Stabilisierung durch Sezernierung und Einbettung in ihre eigene EZM benötigen die HUVEC mehr Zeit. Darüber hinaus bot die spindelförmige Morphologie der Zellen im EBM-2 K1 Kultur-

system und die Ausbildung größerer langgezogener Zellcluster eine bessere Angriffsfläche für die Scherkräfte, als es bei flach ausgebreiteten Endothelzellen mit dem typischen Muster eines Kopfsteinpflasters der Fall gewesen wäre.

### 8. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Bezug nehmend auf das zu Beginn definierte erste Ziel der Dissertation, der Etablierung eines für polymere Festkörperoberflächen geeigneten *in vitro* Selektionsverfahrens und dem Screening nach PEI bindenden Liganden, konnten mit der angewendeten Nukleinsäure-basierten Selektionsstrategie DNS-Aptamere isoliert werden, welche eine deutlich erhöhte Affinität zur polymeren Oberfläche aufwiesen. Die Bindung dieser isolierten DNS-Liganden war im Vergleich zur unselektierten Ausgangsbibliothek deutlich erhöht, was auf eine durch die SELEX bedingte verbesserte und über optimierte, multivalente Interaktionen vermittelte Bindung an die Oberfläche des Modellpolymers PEI hindeutet.

Die als zweites Ziel dieser Dissertation definierte Charakterisierung der Aptamerbindung hinsichtlich der Ligandenverteilung, -dichte und Stabilität der Beschichtung auf der PEI-Oberfläche, als auch die weitergehende Analyse der isolierten Bindungsmotive in Korrelation mit den Grenzflächeneigenschaften des PEI, zeigten eine ausgeprägte Interaktion der selektierten Aptamere mit der Polymeroberfläche. Mit ihnen konnte eine bis in den nm-Bereich flächendeckende Beschichtung des polymeren Substrates erreicht werden, welches als Basis für die weitere nicht-kovalente Immobilisierung zellbindender Liganden eingesetzt werden kann. Das Screening der kombinatorischen Oligonukleotidbibliothek gegen PEI resultierte in der Isolierung eines primär durch die Nukleotidbase Thymin dominierten Bindungsmotives, welches jedoch entgegen den Erwartungen kein materialelektives Bindungsverhalten zeigte, sondern unabhängig von der Oberflächenchemie ebenso eine Affinität für andere polymere Oberflächen mit ähnlichen makroskopischen Benetzungs- und Ladungseigenschaften aufwies. Eine präzise Betrachtung der molekularen Eigenschaften der angereicherten Aptamere offenbarte, dass Thymin bzw. ein auf dieser Nukleotidbase basierendes Bindungsmotiv bei der Interaktion mit der polymeren Oberfläche bevorzugt war. Die Gründe hierfür liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der chemischen Struktur und einer damit im Vergleich zu anderen Nukleotidbasen geringeren elektrostatischen Repulsion durch das  $\pi$ -Elektronensystem sowie einer durch den hydrophoben Charakter von Thymin maximierten Entropie. Diese strukturellen Eigenschaften befähigten Aptamere mit einer durch Thymin dominierten Sequenz dazu, in engen Kontakt mit einer wenig benetzbaren und durch ein leicht negatives Potenzial gekennzeichneten Polymeroberfläche zu treten. Erst in unmittelbarer Nähe zum Polymer konnten über kurzreichweitige physikalische WW multivalente Interaktionen zwischen den Nukleotidbasen der Aptamere und den chemischen Strukturelementen der Polymeroberfläche eingegangen werden, welche für eine hohe Affinität und Selektivität des Liganden essentiell sind. In nachfolgenden *in vitro* Bindungsstudien zeigte sich ebenso, dass die Aptamerbindung hochgradig von divalenten Kationen abhängig und unter dem Einfluss bestimmter proteinogener Bestandteile im umgebenden Medium instabil war.

In der als drittes Ziel der Dissertation definierten *in vitro* Machbarkeitstudie konnte mit Hilfe der polymerbindenden Aptamere ein zellbindender Ligand (cRGD) über nicht-kovalente Interaktionen

auf PEI immobilisiert und die initiale Adhärenz und Scherresistenz von Endothelzellen im Vergleich zum unbehandelten Polymer signifikant verbessert werden. Jedoch war die Aptamer gestützte Immobilisierung von cRGD bestimmten Limitationen hinsichtlich der umgebenden Bedingungen unterworfen. So musste das Zellkultursystem von störenden proteinogenen Einflüssen wie bovinem Serum und bestimmten Wachstumsfaktoren befreit werden, was nach etwa einem Tag zum Adhärenzverlust der Endothelzellen führte. Diese Anpassungen im *in vitro* Modell verhindern maßgeblich die Nutzbarkeit der polymerbindenden Aptamere für eine *in vivo* Anwendung. Dennoch wäre der *in vitro* Einsatz der Aptamer-cRGD Beschichtung in der vorgestellten Form für eine Verbesserung der initialen Adhärenz von Endothelzellen auf PEI-Filmen für die ersten Stunden nach der Aussaat sinnvoll. Nach der Ausnutzung dieses positiven Effektes würde der Wechsel auf das Vollmedium erfolgen und somit durch die im Vergleich zum unbehandelten Polymer erhöhte Zelldichte die schnellere Ausbildung eines geschlossenen und funktionellen Endothelzelllayers möglich sein.

Als finale Schlussfolgerung konnte im Rahmen der hier vorgestellten Dissertation gezeigt werden, dass eine Anreicherung und Isolierung multivalent an polymere Oberflächen bindender Liganden mittels nukleinsäurebasierter *in vitro* Selektionsverfahren möglich ist. Hierbei wurden durch das verwendete Screeningverfahren Liganden generiert, welche anders als bisherige Strategien zur nicht-kovalenten Immobilisierung niedermolekularer zellbindender Liganden, unterschiedliche physikalische Interaktionsmöglichkeiten auszunutzen. Bewiesen wurde dies durch die Anreicherung der gleichen bindenden Aptamere gegen polymere Oberflächen, welche aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung unterschiedliche WW mit den Nukleinsäurebasen eingehen können. Trotz der fehlenden Materialelektivität der generierten DNS-Aptamere konnte mittels einer auf ihnen basierenden Beschichtung eine bis in den nm-Bereich flächendeckende Modifizierung polymerer Oberflächen erreicht werden. Für die Generierung materialelektiver und unter *in vivo* Bedingungen stabil bindender Aptamere ist jedoch ein besseres Verständnis der treibenden Kräfte für deren initiale Rekrutierung an polymere Oberflächen sowie der intermolekularen Interaktionen vor dem eigentlichen Materialkontakt nötig bzw. wird das Wissen benötigt auf welchem Weg diese manipuliert werden können, um die Oberflächenchemie des Substrates als selektionstreibende Eigenschaft beim Screening mehr in den Vordergrund zu rücken.

### 9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996;274:740-3.
- [2] Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mahonen M, Ngu Blackett K, et al. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int J Epidemiol* 2011;40:139-46.
- [3] Janairo RRR, Henry JJ, Lee BL-P, Hashi CK, Derugin N, Lee R, et al. Heparin-modified small-diameter nanofibrous vascular grafts. *NanoBioscience, IEEE Transactions on* 2012;11:22-7.
- [4] McLarty AJ, Phillips MR, Holmes DR, Jr., Schaff HV. Aortocoronary bypass grafting with expanded polytetrafluoroethylene: 12-year patency. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1442-4.
- [5] Veith FJ, Moss CM, Sprayregen S, Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery* 1979;85:253-6.
- [6] Kääpä P, Viinikka L, Ylikorkala O. Plasma prostacyclin from birth to adolescence. *Archives of disease in childhood* 1982;57:459-61.
- [7] Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005;74:570-81.
- [8] Takagi H, Goto SN, Matsui M, Manabe H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting. *Journal of vascular surgery* 2010;52:232-6.
- [9] Van der Zijpp Y, Poot A, Feijen J. Endothelialization of small-diameter vascular prostheses. *Archives of physiology and biochemistry* 2003;111:415-27.
- [10] Faries PL, LoGerfo FW, Arora S, Hook S, Pulling MC, Akbari CM, et al. A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: all-autogenous conduit versus prosthetic grafts. *Journal of vascular surgery* 2000;32:1080-90.
- [11] Klinkert P, Post P, Breslau P, Van Bockel J. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2004;27:357-62.
- [12] Robinson DR, Varcoe RL, Chee W, Subramaniam PS, Benveniste GL, Fitridge RA. Long-term follow-up of last autogenous option arm vein bypass. *ANZ J Surg* 2013;83:769-73.
- [13] Roll S, Muller-Nordhorn J, Keil T, Scholz H, Eidt D, Greiner W, et al. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery--systematic review and meta-analysis. *BMC surgery* 2008;8:22.
- [14] Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World journal of surgery* 2007;31:682-9.
- [15] Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009-27.
- [16] Jung F, Braune S, Lendlein A. Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2013;53:97-115.
- [17] Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function cardiac events. *Circulation* 2005;111:363-8.
- [18] Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993;22:S1&hyphen.
- [19] Li S, Henry JJ. Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. *Annual review of biomedical engineering* 2011;13:451-75.
- [20] Naito Y, Williams-Fritze M, Duncan DR, Church SN, Hibino N, Madri JA, et al. Characterization of the natural history of extracellular matrix production in tissue-engineered vascular grafts during neovessel formation. *Cells Tissues Organs* 2012;195:60-72.
- [21] Patel SD, Waltham M, Wadoodi A, Burnand KG, Smith A. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2010;4:129-41.
- [22] Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, et al. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circulation research* 2009;104:1313-7.
- [23] De Mel A, Cousins BG, Seifalian AM. Surface modification of biomaterials: a quest for blood compatibility. *International journal of biomaterials* 2012;2012.
- [24] Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:695-704.
- [25] White J. Anatomy and structural organization of the platelet. *Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice* 1994;2:397-413.

- [26] Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* 2005;26:6811-7.
- [27] Solouk A, Cousins BG, Mirzadeh H, Seifalian AM. Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: a review. *Biotechnology and applied biochemistry* 2011;58:311-27.
- [28] Waage A, Slupphaug G, Shalaby R. Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 1990;20:2439-43.
- [29] Andrade J, Hlady V. Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC*: Springer; 1986. p. 1-63.
- [30] Norde W, Lyklema J. Why proteins prefer interfaces. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 1991;2:183-202.
- [31] Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influence implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry* 2008;8:270.
- [32] Sivaraman B, Latour RA. The adherence of platelets to adsorbed albumin by receptor-mediated recognition of binding sites exposed by adsorption-induced unfolding. *Biomaterials* 2010;31:1036-44.
- [33] Geremek M, Trochimczuk M, Janik M, Malek G, Ostrowski K. Popliteal vein aneurysm: Is it necessary to apply anticoagulants after a surgery? *Phlebologie* 2014;43:89-92.
- [34] Fiedler KA, Byrne RA, Schulz S, Sibbing D, Mehilli J, Ibrahim T, et al. Rationale and design of The Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen—Testing of a six-week versus a six-month clopidogrel treatment Regimen In Patients with concomitant aspirin and oral anticoagulant therapy following drug-Eluting stenting (ISAR-TRIPLE) study. *American heart journal* 2014;167:459-65. e1.
- [35] Zhang K, Liu T, Li JA, Chen JY, Wang J, Huang N. Surface modification of implanted cardiovascular metal stents: From antithrombosis and antirestenosis to endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102:588-609.
- [36] Chen H, Chen Y, Sheardown H, Brook MA. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials* 2005;26:7418-24.
- [37] Hashi CK, Derugin N, Janairo RRR, Lee R, Schultz D, Lotz J, et al. Antithrombogenic modification of small-diameter microfibrillar vascular grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:1621-7.
- [38] Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* 2001;31:81-110.
- [39] Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;6:41-75.
- [40] Tepe G, Schmehl J, Wendel HP, Schaffner S, Heller S, Gianotti M, et al. Reduced thrombogenicity of nitinol stents—in vitro evaluation of different surface modifications and coatings. *Biomaterials* 2006;27:643-50.
- [41] Braune S, Hönow A, Mrowietz C, Cui J, Kratz K, Hellwig J, et al. Hemocompatibility of soft hydrophobic poly (n-butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2010;49:375-90.
- [42] Braune S, Lange M, Richau K, Lützow K, Weigel T, Jung F, et al. Interaction of thrombocytes with poly (ether imide): The influence of processing. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2009;46:239-50.
- [43] Chapman RG, Ostuni E, Takayama S, Holmlin RE, Yan L, Whitesides GM. Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins. *Journal of the American Chemical Society* 2000;122:8303-4.
- [44] Higuchi A, Hashiba H, Hayashi R, Yoon BO, Sakurai M, Hara M. Serum protein adsorption and platelet adhesion on aspartic-acid-immobilized polysulfone membranes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2004;15:1051-63.
- [45] Aldenhoff YB, Koole LH. Studies on a new strategy for surface modification of polymeric biomaterials. *Journal of biomedical materials research* 1995;29:917-28.
- [46] Paternotte E, Kerdjoudj H, Kokten T, Stoltz JF, Kearney-Schwartz A, Voegel JC, et al. Endothelialized and preconditioned natural umbilical arteries with long term patency open the route for future human uses. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2013;54:223-34.
- [47] Rolli CG, Nakayama H, Yamaguchi K, Spatz JP, Kemkemer R, Nakanishi J. Switchable adhesive substrates: revealing geometry dependence in collective cell behavior. *Biomaterials* 2012;33:2409-18.
- [48] Gong P, Grainger DW. *Nonfouling Surfaces. Microarrays*: Springer; 2007. p. 59-92.
- [49] Yang Z, Wang J, Luo R, Maitz MF, Jing F, Sun H, et al. The covalent immobilization of heparin to pulsed-plasma polymeric allylamine films on 316L stainless steel and the resulting effects on hemocompatibility. *Biomaterials* 2010;31:2072-83.

- [50] Yang Z, Tu Q, Wang J, Huang N. The role of heparin binding surfaces in the direction of endothelial and smooth muscle cell fate and re-endothelialization. *Biomaterials* 2012;33:6615-25.
- [51] Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs* 2012;195:144-58.
- [52] Alobaid N, Salacinski HJ, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM. Single stage cell seeding of small diameter prosthetic cardiovascular grafts. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2005;33:209-26.
- [53] Melchiorri AJ, Hibino N, Fisher JP. Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue engineering Part B, Reviews* 2013;19:292-307.
- [54] Schopka S, Schmid FX, Hirt S, Birnbaum DE, Schmid C, Lehle K. Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: in vitro hemocompatibility assessment. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2009;88:130-8.
- [55] Hoepken S, Fuhrmann R, Jung F, Franke R. Shear resistance of human umbilical endothelial cells on different materials covered with or without extracellular matrix: controlled in-vitro study. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2008;43:157-66.
- [56] Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 2005;26:1253-9.
- [57] Müller R, Abke J, Schnell E, Macionczyk F, Gbureck U, Mehrl R, et al. Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility. *Biomaterials* 2005;26:6962-72.
- [58] Lu S, Zhang P, Sun X, Gong F, Yang S, Shen L, et al. Synthetic ePTFE grafts coated with an anti-CD133 antibody-functionalized heparin/collagen multilayer with rapid in vivo endothelialization properties. *ACS applied materials & interfaces* 2013;5:7360-9.
- [59] Goddard JM, Hotchkiss J. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in polymer science* 2007;32:698-725.
- [60] Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol* 1993;265:C289-98.
- [61] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003;24:4385-415.
- [62] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47:1786-95.
- [63] Hsu Sh, Sun Sh, Chen DC. Improved Retention of Endothelial Cells Seeded on Polyurethane Small-diameter Vascular Grafts Modified by a Recombinant RGD-containing Protein. *Artificial organs* 2003;27:1068-78.
- [64] Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophysical journal* 1996;71:2869-84.
- [65] Avci-Adali M, Stoll H, Wilhelm N, Perle N, Schlensak C, Wendel HP. In vivo tissue engineering: Mimicry of homing factors for self-endothelialization of blood-contacting materials. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2013;80:176-81.
- [66] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;45:1574-9.
- [67] Klomp M, Beijik MA, De Winter RJ. Genous™ endothelial progenitor cell-capturing stent system: a novel stent technology. *Expert review of medical devices* 2009;6:365-75.
- [68] Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation* 2005;112:12-8.
- [69] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-8.
- [70] Veleva AN, Heath DE, Cooper SL, Patterson C. Selective endothelial cell attachment to peptide-modified terpolymers. *Biomaterials* 2008;29:3656-61.
- [71] Hoffmann J, Paul A, Harwardt M, Groll J, Reeswinkel T, Klee D, et al. Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;84:614-21.



- [72] Strahm Y, Flueckiger A, Billinger M, Meier P, Mettler D, Weisser S, et al. Endothelial-cell-binding aptamer for coating of intracoronary stents. *J Invasive Cardiol* 2010;22:481-7.
- [73] Ku SH, Park CB. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 2010;31:9431-7.
- [74] Lee H, Lee BP, Messersmith PB. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* 2007;448:338-41.
- [75] Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *science* 2007;318:426-30.
- [76] Kang SM, Park S, Kim D, Park SY, Ruoff RS, Lee H. Simultaneous Reduction and Surface Functionalization of Graphene Oxide by Mussel-Inspired Chemistry. *Advanced Functional Materials* 2011;21:108-12.
- [77] Sun P, Lu H, Yao X, Tu X, Zheng Z, Wang X. Facile and universal immobilization of L-lysine inspired by mussels. *Journal of Materials Chemistry* 2012;22:10035-41.
- [78] Yin M, Yuan Y, Liu C, Wang J. Development of mussel adhesive polypeptide mimics coating for in-situ inducing re-endothelialization of intravascular stent devices. *Biomaterials* 2009;30:2764-73.
- [79] Tzoneva R, Seifert B, Albrecht W, Richau K, Groth T, Lendlein A. Hemocompatibility of poly (ether imide) membranes functionalized with carboxylic groups. *Journal of materials science: materials in medicine* 2008;19:3203-10.
- [80] Chan C-M, Ko T-M, Hiraoka H. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface science reports* 1996;24:1-54.
- [81] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering* 2004;32:477-86.
- [82] Desai SM, Singh R. Surface modification of polyethylene. *Long Term Properties of Polyolefins: Springer; 2004. p. 231-94.*
- [83] Situma C, Wang Y, Hupert M, Barany F, McCarley RL, Soper SA. Fabrication of DNA microarrays onto poly (methyl methacrylate) with ultraviolet patterning and microfluidics for the detection of low-abundant point mutations. *Analytical biochemistry* 2005;340:123-35.
- [84] Hegemann D, Brunner H, Oehr C. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2003;208:281-6.
- [85] Gengenbach TR, Griesser HJ. Post-deposition ageing reactions differ markedly between plasma polymers deposited from siloxane and silazane monomers. *Polymer* 1999;40:5079-94.
- [86] Lamb S, Stuckey D. Enzyme immobilization on colloidal liquid aphrons (CLAs): the influence of system parameters on activity. *Enzyme and microbial technology* 2000;26:574-81.
- [87] Siow KS, Britcher L, Kumar S, Griesser HJ. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization-A Review. *Plasma processes and polymers* 2006;3:392-418.
- [88] Coyle CH, Mendralla S, Lanasa S, Kader KN. Endothelial cell seeding onto various biomaterials causes superoxide-induced cell death. *Journal of biomaterials applications* 2007;22:55-69.
- [89] de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules* 2008;9:2969-79.
- [90] Tahiri-Alaoui A, Frigotto L, Manville N, Ibrahim J, Romby P, James W. High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic acids research* 2002;30:e45.
- [91] Horbett T. Proteins: structure, properties, and adsorption to surfaces. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* 1996:133-41.
- [92] Andukuri A, Minor WP, Kushwaha M, Anderson JM, Jun H-W. Effect of endothelium mimicking self-assembled nanomatrices on cell adhesion and spreading of human endothelial cells and smooth muscle cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2010;6:289-97.
- [93] Date T, Sekine J, Matsuno H, Serizawa T. Polymer-binding peptides for the noncovalent modification of polymer surfaces: effects of peptide density on the subsequent immobilization of functional proteins. *ACS applied materials & interfaces* 2011;3:351-9.
- [94] Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annual review of biochemistry* 1995;64:763-97.
- [95] Jayasena SD. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* 1999;45:1628-50.

- [96] Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect. *Biomaterials* 2007;28:405-22.
- [97] Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2008;27:108-17.
- [98] Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, Richards-Kortum R. Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging. *Bioconjugate chemistry* 2008;19:1309-12.
- [99] Hunter CA, Sanders JK. The nature of pi-pi interactions. *Journal of the American Chemical Society* 1990;112:5525-34.
- [100] Mignon P, Loverix S, Steyaert J, Geerlings P. Influence of the pi-pi interaction on the hydrogen bonding capacity of stacked DNA/RNA bases. *Nucleic acids research* 2005;33:1779-89.
- [101] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990;346:818-22.
- [102] Tuerk C, MacDougall S, Gold L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:6988-92.
- [103] Breaker RR. DNA aptamers and DNA enzymes. *Current opinion in chemical biology* 1997;1:26-31.
- [104] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990;249:505-10.
- [105] Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
- [106] Patel DJ. Structural analysis of nucleic acid aptamers. *Current opinion in chemical biology* 1997;1:32-46.
- [107] Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang L, Fan P, Kumar RA, et al. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of molecular biology* 1997;272:645-64.
- [108] Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 1994;263:1425-9.
- [109] Win MN, Klein JS, Smolke CD. Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay. *Nucleic acids research* 2006;34:5670-82.
- [110] Sassanfar M, Szostak JW. An RNA motif that binds ATP. *Nature* 1993;364:550-3.
- [111] Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic acids research* 1996;24:1029-36.
- [112] Wallace ST, Schroeder R. In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA* 1998;4:112-23.
- [113] Williams KP, Liu XH, Schumacher TN, Lin HY, Ausiello DA, Kim PS, et al. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:11285-90.
- [114] Tasset DM, Kubik MF, Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of molecular biology* 1997;272:688-98.
- [115] Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol* 1996;157:221-30.
- [116] Jellinek D, Green LS, Bell C, Lynott CK, Gill N, Vargeese C, et al. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1995;34:11363-72.
- [117] JENISON RD, JENNINGS SD, WALKER DW, BARGATZE RF, PARMA D. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 1998;8:265-79.
- [118] Chen HW, Medley CD, Sefah K, Shangguan D, Tang Z, Meng L, et al. Molecular Recognition of Small-Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers. *ChemMedChem* 2008;3:991-1001.
- [119] Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:11838-43.
- [120] Guo J, Gao X, Su L, Xia H, Gu G, Pang Z, et al. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials* 2011;32:8010-20.
- [121] Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:15416-21.

- [122] Cheng C, Dong J, Yao L, Chen A, Jia R, Huan L, et al. Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX. *Biochemical and biophysical research communications* 2008;366:670-4.
- [123] DeStefano JJ, Cristofaro JV. Selection of primer-template sequences that bind human immunodeficiency virus reverse transcriptase with high affinity. *Nucleic acids research* 2006;34:130-9.
- [124] Cao X, Li S, Chen L, Ding H, Xu H, Huang Y, et al. Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic acids research* 2009;37:4621-8.
- [125] Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *Reviews in Molecular Biotechnology* 2000;74:27-38.
- [126] Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:20556-67.
- [127] Kato Y, Minakawa N, Komatsu Y, Kamiya H, Ogawa N, Harashima H, et al. New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX. *Nucleic acids research* 2005;33:2942-51.
- [128] Darfeuille F, Reigadas S, Hansen JB, Orum H, Di Primo C, Toulmé J-J. Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides. *Biochemistry* 2006;45:12076-82.
- [129] Schmidt KS, Borkowski S, Kurreck J, Stephens AW, Bald R, Hecht M, et al. Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic acids research* 2004;32:5757-65.
- [130] Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews Drug discovery* 2006;5:123-32.
- [131] Nolte A, Klussmann S, Bald R, Erdmann VA, Furste JP. Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature biotechnology* 1996;14:1116-9.
- [132] Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Furste JP. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature biotechnology* 1996;14:1112-5.
- [133] Tombelli S, Minunni M, Luzzi E, Mascini M. Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry* 2005;67:135-41.
- [134] Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society* 2004;126:20-1.
- [135] Mayer G, Ahmed MS, Dolf A, Endl E, Knolle PA, Famulok M. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nature protocols* 2010;5:1993-2004.
- [136] Sefah K, Shanguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature protocols* 2010;5:1169-85.
- [137] Avci-Adali M, Metzger M, Perle N, Ziemer G, Wendel HP. Pitfalls of cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX): existing dead cells during in vitro selection anticipate the enrichment of specific aptamers. *Oligonucleotides* 2010;20:317-23.
- [138] Theis MG, Knorre A, Kellersch B, Moelleken J, Wieland F, Kolanus W, et al. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:11221-6.
- [139] Missailidis S, Thomaidou D, Borbas KE, Price MR. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immunol Methods* 2005;296:45-62.
- [140] Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, White PA. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006;50:3019-27.
- [141] Avci-Adali M, Wilhelm N, Perle N, Stoll H, Schlensak C, Wendel HP. Absolute quantification of cell-bound DNA aptamers during SELEX. *Nucleic acid therapeutics* 2013;23:125-30.
- [142] Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International* 2012;2012.
- [143] Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 2008;24:133-41.
- [144] Imai Y, Watanabe A, Masuhara E. Structure-biocompatibility relationship of condensation polymers. *Journal of biomedical materials research* 1983;17:905-12.

- [145] Richardson R, Miller J, Reichert W. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing. *Biomaterials* 1993;14:627-35.
- [146] Peluso G, Petillo O, Ambrosio L, Nicolais L. Polyetherimide as biomaterial: preliminary in vitro and in vivo biocompatibility testing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1994;5:738-42.
- [147] Petillo O, Peluso G, Ambrosio L, Nicolais L, Kao WJ, Anderson JM. In vivo induction of macrophage Ia antigen (MHC class II) expression by biomedical polymers in the cage implant system. *J Biomed Mater Res* 1994;28:635-46.
- [148] Merolli A, Perrone V, Leali PT, Ambrosio L, De Santis R, Nicolais L, et al. Response to polyetherimide based composite materials implanted in muscle and in bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1999;10:265-8.
- [149] Trimpert C, Boese G, Albrecht W, Richau K, Weigel T, Lendlein A, et al. Poly (ether imide) membranes modified with poly (ethylene imine) as potential carriers for epidermal substitutes. *Macromolecular bioscience* 2006;6:274-84.
- [150] Kim SB, Jo JH, Lee SM, Kim HE, Shin KH, Koh YH. Use of a poly (ether imide) coating to improve corrosion resistance and biocompatibility of magnesium (Mg) implant for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2013;101:1708-15.
- [151] Seifert B, Mihanetzis G, Groth T, Albrecht W, Richau K, Missirlis Y, et al. Polyetherimide: A New Membrane-Forming Polymer for Biomedical Applications. *Artificial organs* 2002;26:189-99.
- [152] Hiebl B, Lützwow K, Lange M, Jung F, Seifert B, Klein F, et al. Cytocompatibility testing of cell culture modules fabricated from specific candidate biomaterials using injection molding. *Journal of biotechnology* 2010;148:76-82.
- [153] Tzoneva R, Seifert B, Albrecht W, Richau K, Lendlein A, Groth T. Poly(ether imide) membranes: studies on the effect of surface modification and protein pre-adsorption on endothelial cell adhesion, growth and function. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 2008;19:837-52.
- [154] Roch T, Schulz C, Jung F, Ma N, Lendlein A. Interaction of poly(ether imide) films with early immune mechanisms. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2014;57:203-12.
- [155] Arnstein SA, Sherrill CD. Substituent effects in parallel-displaced [small pi]-[small pi] interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2008;10:2646-55.
- [156] Hunter CA. Meldola lecture. The role of aromatic interactions in molecular recognition. *Chem Soc Rev* 1994;23:101-9.
- [157] Mignon P, Loverix S, Geerlings P. Interplay between  $\pi$ - $\pi$  interactions and the H-bonding ability of aromatic nitrogen bases. *Chemical physics letters* 2005;401:40-6.
- [158] Fasting C, Schalley CA, Weber M, Seitz O, Hecht S, Kokschi B, et al. Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angewandte Chemie International Edition* 2012;51:10472-98.
- [159] Barnard A, Smith DK. Self-Assembled Multivalency: Dynamic Ligand Arrays for High-Affinity Binding. *Angewandte Chemie International Edition* 2012;51:6572-81.
- [160] Schneider HJ. Bindungsmechanismen in supramolekularen Komplexen. *Angewandte Chemie* 2009;121:3982-4036.
- [161] Badjic JD, Nelson A, Cantrill SJ, Turnbull WB, Stoddart JF. Multivalency and cooperativity in supramolecular chemistry. *Accounts of chemical research* 2005;38:723-32.
- [162] Vroman L. Effect of adsorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. 1962.
- [163] Watts JF, Wolstenholme J. An introduction to surface analysis by XPS and AES. *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES*, by John F Watts, John Wolstenholme, pp 224 ISBN 0-470-84713-1 Wiley-VCH, May 2003 2003;1.
- [164] Shard AG. Detection limits in XPS for more than 6000 binary systems using Al and Mg  $K\alpha$  X-rays. *Surface and Interface Analysis* 2014;46:175-85.
- [165] Czichos H, Saito T, Smith LR. *Springer handbook of materials measurement methods*: Springer Science & Business Media; 2006.
- [166] Kingshott P, Wei J, Bagge-Ravn D, Gadegaard N, Gram L. Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. *Langmuir* 2003;19:6912-21.
- [167] Adar F. *Depth Resolution of the Raman Microscope: Optical Limitations and Sample Characteristics*. 2010.
- [168] Song J, Yang C, Hu H, Dai X, Wang C, Zhang H. Penetration depth at various Raman excitation wavelengths and stress model for Raman spectrum in biaxially-strained Si. *Science China Physics, Mechanics and Astronomy* 2013;56:2065-70.

- [169] Ghomi M. Applications of Raman spectroscopy to biology: from basic studies to disease diagnosis: IOS Press; 2012.
- [170] Alessandrini A, Facci P. AFM: a versatile tool in biophysics. *Measurement science and technology* 2005;16:R65.
- [171] Schneider M, Zhu M, Papastavrou G, Akari S, Möhwald H. Chemical pulsed-force microscopy of single polyethyleneimine molecules in aqueous solution. *Langmuir* 2002;18:602-6.
- [172] Baró AM, Reifengerger RG. *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications*: John Wiley & Sons; 2012.
- [173] Liang H, Severin N, Fugmann S, Sokolov IM, Rabe JrP. Statistics of Time-Dependent Rupture of Single ds-DNA. *The Journal of Physical Chemistry B* 2013;117:8875-9.
- [174] Westra K, Mitchell A, Thomson D. Tip artifacts in atomic force microscope imaging of thin film surfaces. *Journal of Applied Physics* 1993;74:3608-10.
- [175] Emerson L, Cox G. Charging artefacts in atomic force microscopy. *Micron* 1994;25:267-9.
- [176] De Oliveira R, Albuquerque D, Leite F, Yamaji F, Cruz T. Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications: INTECH Open Access Publisher; 2012.
- [177] Gao F, Leach RK, Petzing J, Coupland JM. Surface measurement errors using commercial scanning white light interferometers. *Measurement Science and Technology* 2008;19:015303.
- [178] Lehmann P. Optical versus tactile geometry measurement: alternatives or counterparts. *Optical Metrology: International Society for Optics and Photonics*; 2003. p. 183-96.
- [179] Young T. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1805:65-87.
- [180] Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* 1936;28:988-94.
- [181] Taggart AF, Taylor TC, Ince CR. *Experiments with flotation reagents*: American Institute of Mining and Metallurgical Engineers, Incorporated; 1929.
- [182] Yuan Y, Lee TR. Contact angle and wetting properties. *Surface science techniques*: Springer; 2013. p. 3-34.
- [183] Kamusewitz H, Possart W, Paul D. Measurement of Thermodynamic quantities by means of solid/water vapor and solid/water/hexadecane systems. *Polymer surfaces and interfaces: characterization, modification, and application VSP* 1997:125-43.
- [184] Hunter RJ. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*: Academic press; 2013.
- [185] Kirby BJ, Hasselbrink EF. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis* 2004;25:187-202.
- [186] Kirby BJ, Hasselbrink EF. Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis* 2004;25:203-13.
- [187] Werner C, Korber H, Zimmermann R, Dukhin S, Jacobasch HJ. Extended Electrokinetic Characterization of Flat Solid Surfaces. *Journal of colloid and interface science* 1998;208:329-46.
- [188] Van Wagenen R, Andrade J. Flat plate streaming potential investigations: hydrodynamics and electrokinetic equivalency. *Journal of colloid and interface science* 1980;76:305-14.
- [189] Zimmermann R, Osaki T, Schweiß R, Werner C. Electrokinetic microslit experiments to analyse the charge formation at solid/liquid interfaces. *Microfluidics and Nanofluidics* 2006;2:367-79.
- [190] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology* 2015:A3. B. 1-A3. B. .
- [191] ISO B. 10993-5: Biological evaluation of medical devices. *Tests for in vitro cytotoxicity* 1999.
- [192] Feugier P, Black R, Hunt J, How T. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials* 2005;26:1457-66.
- [193] Franke R-P, Gräfe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. 1984.
- [194] Bailey TL. DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics* 2011;27:1653-9.
- [195] Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research* 2008;36:W163-W9.
- [196] Zuker M. Calculating nucleic acid secondary structure. *Current opinion in structural biology* 2000;10:303-10.
- [197] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 2003;31:3406-15.

- [198] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 1994;22:4673-80.
- [199] Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947-8.
- [200] Khayet M. Membrane surface modification and characterization by X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy and contact angle measurements. *Applied surface science* 2004;238:269-72.
- [201] Westervelt R. Sabic Innovative Plastics. *Chemical Week* 2010;172:30-1.
- [202] Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry CC. Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of materials science Materials in medicine* 2007;18:1263-77.
- [203] Chung T-W, Liu D-Z, Wang S-Y, Wang S-S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials* 2003;24:4655-61.
- [204] Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB. Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient. *Journal of colloid and interface science* 1998;205:323-30.
- [205] van Wachem PB, Hogt AH, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, et al. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials* 1987;8:323-8.
- [206] Burt HM, Hunter WL. Drug-eluting stents: a multidisciplinary success story. *Advanced drug delivery reviews* 2006;58:350-7.
- [207] Smith HS, Riggs JL, Mosesson MW. Production of fibronectin by human epithelial cells in culture. *Cancer Res* 1979;39:4138-44.
- [208] Grinnell F, Feld M. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *The Journal of biological chemistry* 1982;257:4888-93.
- [209] Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta* 2004;1692:103-19.
- [210] Reinhart-King CA, Dembo M, Hammer DA. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophysical journal* 2005;89:676-89.
- [211] Huang X, Zauscher S, Klitzman B, Truskey GA, Reichert WM, Kenan DJ, et al. Peptide interfacial biomaterials improve endothelial cell adhesion and spreading on synthetic polyglycolic acid materials. *Annals of biomedical engineering* 2010;38:1965-76.
- [212] Ally A, Horrobin D. Thromboxane A2 in blood vessel walls and its physiological significance: relevance to thrombosis and hypertension. *Prostaglandins and Medicine* 1980;4:431-8.
- [213] Muxel S, Fasola F, Radmacher MC, Jabs A, Munzel T, Gori T. Endothelial functions: Translating theory into clinical application. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2010;45:109-15.
- [214] Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. *Journal of vascular surgery* 2007;45:A104-A15.
- [215] Slotman GJ. Plasma thromboxane A2 and prostacyclin concentrations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Surg Oncol* 1988;38:33-7.
- [216] Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. *Exerc immunol rev* 2006;12:41.
- [217] Chen CC, Manning AM. TGF- $\beta$ 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine* 1996;8:58-65.
- [218] Lu DR, Park K. Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen. *Journal of colloid and interface science* 1991;144:271-81.
- [219] Urschel K, Cicha I, Daniel WG, Garlich CD. Shear stress patterns affect the secreted chemokine profile in endothelial cells. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2012;50:143-52.
- [220] Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, Lundin KE, Scholz T, Brandtzaeg P, et al. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998;42:635-42.
- [221] van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials* 1985;6:403-8.
- [222] Hiebl B, Cui J, Kratz K, Frank O, Schossig M, Richau K, et al. Viability, morphology and function of primary endothelial cells on poly (n-butyl acrylate) networks having elastic moduli comparable to arteries. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2012;23:901-15.
- [223] Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circulation Journal* 2009;73:1983-92.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

---

- [224] Galbraith C, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell motility and the cytoskeleton* 1998;40:317-30.
- [225] Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives C. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 1985;227:1477-9.
- [226] McGuigan AP, Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials* 2007;28:2547-71.
- [227] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:2379-93.
- [228] STONE PH, FELDMAN CL. Intracoronary vascular profiling of shear stress, lumen, and wall morphology to predict vascular behavior and atherosclerosis progression Part 1: Rationale and methods. *Cardiology Rounds* 2004;8:1-6.
- [229] Pawley J, Masters BR. Handbook of biological confocal microscopy. *Optical Engineering* 1996;35:2765-6.
- [230] Hoffman AS. Modification of Material Surfaces to Affect How They Interact with Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1987;516:96-101.
- [231] Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:13581-4.
- [232] Schutze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Morl M, et al. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PloS one* 2011;6:e29604.
- [233] Langlet J, Claverie P, Caron F, Boeue J. Interactions between nucleic acid bases in hydrogen bonded and stacked configurations: the role of the molecular charge distribution. *International Journal of Quantum Chemistry* 1981;20:299-338.
- [234] Arnstein SA, Sherrill CD. Substituent effects in parallel-displaced pi-pi interactions. *Phys Chem Chem Phys* 2008;10:2646-55.
- [235] Gung BW, Amicangelo JC. Substituent Effects in C6F6 C6H5X Stacking Interactions. *The Journal of organic chemistry* 2006;71:9261-70.
- [236] Friedman RA, Honig B. A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution. *Biophysical journal* 1995;69:1528.
- [237] Schweitzer BA, Kool ET. Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA. *Journal of the American Chemical Society* 1995;117:1863-72.
- [238] Barhoumi A, Zhang D, Tam F, Halas NJ. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA. *Journal of the American Chemical Society* 2008;130:5523-9.
- [239] Bell SE, Sirimuthu NM. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides. *Journal of the American Chemical Society* 2006;128:15580-1.
- [240] Huang J, Grater SV, Corbellini F, Rinck S, Bock E, Kemkemer R, et al. Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion. *Nano Letters* 2009;9:1111-6.
- [241] Koo LY, Irvine DJ, Mayes AM, Lauffenburger DA, Griffith LG. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *Journal of cell science* 2002;115:1423-33.
- [242] Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of cell science* 2000;113:1677-86.
- [243] Le Saux G, Magenau A, Böcking T, Gaus K, Gooding JJ. The relative importance of topography and RGD ligand density for endothelial cell adhesion. *PloS one* 2011;6:e21869-e.
- [244] Massia SP, Stark J. Immobilized RGD peptides on surface-grafted dextran promote biospecific cell attachment. *J Biomed Mater Res* 2001;56:390-9.
- [245] Cheng S, Craig WS, Mullen D, Tschopp JF, Dixon D, Pierschbacher MD. Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin.  $\alpha$ . IIb.  $\beta$ . 3 antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 1994;37:1-8.
- [246] Bogdanowich-Knipp SJ, Chakrabarti S, Siahann TJ, Williams TD, Dillman RK. Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *The Journal of peptide research* 1999;53:530-41.
- [247] Wang X, Heath DE, Cooper SL. Endothelial cell adhesion and proliferation to PEGylated polymers with covalently linked RGD peptides. *Journal of biomedical materials research Part A* 2012;100:794-801.
- [248] Palm A. Raman Spectrum of Polystyrene. *The Journal of Physical Chemistry* 1951;55:1320-4.

## 10. ANHANG

### 10.1. Gaschromatographie (Headspace-GC)

Da sich verbliebenes Lösungsmittel (DCM), welches in späteren Zellversuchen ins Kulturmedium evaporieren könnte, negativ auf die Zellen auswirken würde, wurde die mögliche Freisetzung verbliebenen Lösungsmittels aus den PEI-Filmen mittels Headspace-GC untersucht. Diese analytische Methode lieferte ein quantitatives Ergebnis über die unter Zellkulturbedingungen aus PEI-Filmen freigesetzte Lösungsmittelmenge. Die in der Inkubationszeit von 96 h aus dem Material ( $\sim 150 \text{ cm}^2$ ) freigesetzte Menge an Lösungsmittel betrug für die gesamte Probe 3,55 ppm.

### 10.2. Datenübersicht der Grenzflächencharakterisierung von PEI, PS und PEVA-Filmen

Die mittels einer taktilen Methode (AFM) bestimmte Rauigkeit von PEI und PS wies bei diesen Materialien auf eine vergleichbar glatte Oberfläche hin. (Tabelle 12)  $R_q$  von PEI lag im Bereich von wenigen Nanometern und es wurden keine größeren rauigkeitsbestimmenden Elemente bei Vergrößerung des Messareals ermittelt. (PEI:  $R_{q(5 \mu\text{m-Scan})} = 2,8 \pm 2,5 \text{ nm}$  bis  $R_{q(50 \mu\text{m-Scan})} = 4,5 \pm 4,7 \text{ nm}$ ) Dennoch wurden in einigen Messungen sternförmige Kavitäten auf PEI detektiert, deren Auswirkungen auf die Oberflächenrauigkeit bereits im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich betrachtet wurden. Ebenso zeigten sich große Unterschied bei der Rauigkeitsbestimmung zwischen der taktilen und der optischen Methode. Auch dies wurde bereits an anderer Stelle diskutiert. Die Untersuchung der Polystyrolfilme ergab für die Scans mit  $50 \mu\text{m}$  Kantenlänge ( $R_{q(50 \mu\text{m-scan})} = 12,0 \pm 1,9 \text{ nm}$ ) eine signifikant größere Oberflächenrauigkeit im Vergleich zu kleineren Scanarealen. (PS:  $R_{q(5 \mu\text{m-Scan})} = 6,5 \pm 3,5 \text{ nm}$  und  $R_{q(15 \mu\text{m-Scan})} = 6,6 \pm 2,3 \text{ nm}$ ) Demnach kann durch die Messung bis zu einer Scangröße von  $50 \mu\text{m}$  Kantenlänge eine Erfassung aller rauigkeitsbestimmenden Elemente nicht garantiert werden. Dennoch zeigten die profilometrischen Untersuchungen für PS bei vergleichbarer Messfläche von  $(50 \times 50) \mu\text{m}^2$  eine Rauigkeit im Bereich von  $R_q = 30 \pm 10 \text{ nm}$ , welche sich bei größeren Scanarealen von bis zu  $(4 \times 0,25) \text{ mm}^2$  nur geringfügig veränderte. Als einziges der drei verwendeten Polymere zeigte die PEVA eine verhältnismäßig unregelmäßige Oberfläche mit einer im Vergleich zu den anderen Materialien etwa 10-fach erhöhten Rauigkeit. Ebenso ging eine Vergrößerung der Scanfläche mit einem signifikanten Anstieg der Rauigkeit einher. (PEVA:  $R_q$  von  $29,7 \pm 12,8 \text{ nm}$ ,  $80,1 \pm 20,7 \text{ nm}$  und  $122,8 \pm 26,9 \text{ nm}$ , jeweils für Scanareale von  $5$ ,  $15$  und  $50 \mu\text{m}$  Kantenlänge) Dieses Ergebnis wurde von den profilometrischen Messungen bestätigt. Die ermittelte Rauigkeit unterschied sich bei vergleichbarer Scanfläche nicht zwischen den beiden verwendeten Methoden. Die weitere Vergrößerung der Messfläche brachte erneut eine erhöhte Rauigkeit der PEVA-Filme mit sich.



**Tabelle 12. Topographie verwendeter polymerer Biomaterialien vergleichend bestimmt mittels AFM und optischer Profilometrie.** (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; AFM: \*,\*\*,\*\*\*\* p zum jeweils kleineren Scanareal, \*p < 0,05, \*\*p < 0,005, \*\*\*\*p < 0,0001, n = 6; Profilometrie:  $n_{(50 \times 50 \mu\text{m})} = 9$ ;  $n_{(4 \times 0,25\text{mm})} = 3$ )

	AFM				optische Profilometrie		
	mittlere Rauigkeit [nm]	Scan Kantenlänge [ $\mu\text{m}$ ]			mittlere Rauigkeit [ $\mu\text{m}$ ]	Scanfläche	
		5	15	50		(50 x 50) $\mu\text{m}^2$	(4 x 0,25) $\text{mm}^2$
PEI	R <sub>a</sub>	2,0 $\pm$ 2,0	2,7 $\pm$ 3,0	2,9 $\pm$ 3,0	R <sub>a</sub>	2,93 $\pm$ 0,80	6,28 $\pm$ 1,79
	R <sub>q</sub>	2,8 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 4,4	4,4 $\pm$ 4,7	R <sub>q</sub>	5,72 $\pm$ 0,66	9,14 $\pm$ 1,69
PS	R <sub>a</sub>	4,9 $\pm$ 2,9	4,7 $\pm$ 1,5	8,0 $\pm$ 1,3****	R <sub>a</sub>	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
	R <sub>q</sub>	6,5 $\pm$ 3,5	6,6 $\pm$ 2,3	12,0 $\pm$ 1,9*	R <sub>q</sub>	0,03 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,03
PEVA	R <sub>a</sub>	22,1 $\pm$ 9,7	60,0 $\pm$ 17,2**	91,9 $\pm$ 23,9*	R <sub>a</sub>	0,05 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,06
	R <sub>q</sub>	29,7 $\pm$ 12,8	80,1 $\pm$ 20,7**	122,8 $\pm$ 26,9*	R <sub>q</sub>	0,08 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,30

Für die Verifizierung der chemischen Oberflächenkomposition wurden die verwendeten Polymere mittels XPS und Raman Spektroskopie analysiert. Wie bereits beschrieben entsprach die Zusammensetzung der PEI-Oberfläche hinsichtlich C, N und O den Erwartungen aus der chemischen Struktur und der Literatur. [200] (Tabelle 13)

**Tabelle 13. Mittels XPS analysierte atomare Oberflächenzusammensetzung verwendeter polymerer Biomaterialien.** (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 6)

	Chemische Zusammensetzung [at-%]						N/C	O/C
	C	N	O	S	P	Si		
PEI	83,3 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,1	12,8 $\pm$ 0,1	0	0	0,3 $\pm$ 0,1	0,043 $\pm$ 0,001	0,154 $\pm$ 0,002
PS	85,7 $\pm$ 2,0	0,5 $\pm$ 0,1	10,2 $\pm$ 1,4	0,7 $\pm$ 0,2	0	1,9 $\pm$ 0,2	0,005 $\pm$ 0,001	0,119 $\pm$ 0,018
PEVA	85,8 $\pm$ 1,7	0	12,6 $\pm$ 1,3	0	0	1,7 $\pm$ 0,4	0	0,147 $\pm$ 0,018

Ebenso zeigten die Raman spektroskopischen Untersuchungen keine, für intaktes PEI, unspezifischen Molekülschwingungen. (Abbildung 53) Die Durchführung von Messungen an verschiedenen Messpunkten auf dem Polymerfilm wies beim PEI, als auch bei den beiden anderen Polymeren auf eine chemisch homogene Oberfläche hin. Die Analyse der PS Oberfläche hingegen ergab teilweise konträre Ergebnisse hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung. Die atomare Analyse mittels XPS wies auf das Vorhandensein größerer Mengen an Sauerstoff sowie leichten Kontaminationen von Stickstoff, Schwefel und Silizium hin. Der nachgewiesene Sauerstoff kann hierbei auf eine (nicht unübliche) partielle Oxidation der PS Oberfläche zurückgeführt werden. In den korrespondierenden Raman Spektren konnten keine charakteristischen Schwingungen für Moleküle mit den zuvor genannten Elementen nachgewiesen werden. (Abbildung 55 und Tabelle

15) Der Grund hierfür lag mit hoher Wahrscheinlichkeit in der größeren Informationstiefe des Lasers bei der Raman Analyse begründet, wodurch ein vergleichsweise stärkeres Signal aus dem Inneren des Polymers erhalten wurde. Bei einer stärkeren Oxidation von Polystyrol wäre beispielsweise die C=O Valenzschwingung zwischen  $1.800 - 1.580 \text{ cm}^{-1}$  detektierbar gewesen. [248] Die chemische Zusammensetzung der verwendeten PEVA-Filme entsprach, wie bei den PEI-Filmen den Erwartungen aus der chemischen Struktur. Die einzige Auffälligkeit war eine geringe Verunreinigung mit Silizium, wie sie ebenfalls bereits bei den PS-Filmen detektiert wurde. Die aufgenommenen Raman Spektren an verschiedenen Orten des Polymerfilms bewiesen erneut die chemisch homogene Oberfläche mit den für PEVA typischen Molekülschwingungen. (vgl. Abbildung 54 und Tabelle 14)

**Tabelle 14. Zuordnung der Schwingungen aus den Raman Spektren der PEVA-Filme.** (vgl. Abbildung 54)

Peak [cm <sup>-1</sup> ]	Schwingung	
2.935	asymmetrische CH <sub>2</sub> -Valenzschwingung (v <sub>as</sub> CH <sub>2</sub> )	2.925 ± 10 cm <sup>-1</sup>
<b>2.882</b>	symmetrische CH <sub>3</sub> -Valenzschwingung (v <sub>s</sub> CH <sub>3</sub> )	2.870 ± 10 cm <sup>-1</sup>
<b>2.849</b>	symmetrische CH <sub>2</sub> -Valenzschwingung (v <sub>as</sub> CH <sub>2</sub> )	2.850 ± 10 cm <sup>-1</sup>
1.737	CO-Valenzschwingung von Alkylestern (vCO)	1.750 cm <sup>-1</sup> bis 1.730 cm <sup>-1</sup>
<b>1.440</b>	CH <sub>3</sub> - Deformationsschwingung (δ <sub>as</sub> CH <sub>3</sub> )	1.480 cm <sup>-1</sup> - 1.350 cm <sup>-1</sup>
<b>1.296</b>	aliphatische CC - Valenzschwingung (vCC)	1.300 cm <sup>-1</sup> - 600 cm <sup>-1</sup>
1.128	asymmetrische Valenzschwingung der C-O-C - Gruppe (v <sub>as</sub> COC)	1.150 cm <sup>-1</sup> - 1.060 cm <sup>-1</sup>
1.063		

**Tabelle 15. Zuordnung der Schwingungen aus den Raman Spektren der PS-Filme.** (vgl. Abbildung 55)

Peak [cm <sup>-1</sup> ]	Schwingung	
<b>3.059</b>	aromatische C-H-Valenzschwingung (vCH)	3.200 - 3.000 cm <sup>-1</sup>
3.001		
2.978	Valenzschwingungen gesättigter aliphatischer Gruppen (v <sub>s</sub> & v <sub>as</sub> CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> )	3.000 - 2.800 cm <sup>-1</sup>
<b>2.908</b>		
2.852		
<b>1.603</b>	aromatische Ringschwingungen (vCC)	1.620 cm <sup>-1</sup> bis 1.400 cm <sup>-1</sup>
1.583		
1.451	asymmetrische Deformationsschwingung für Alkane (δ <sub>as</sub> CH <sub>2</sub> )	1.460 ± 10 cm <sup>-1</sup>
1.330	Valenzschwingungen des aliphatischen C-C - Gerüsts (vCC)	1.300 cm <sup>-1</sup> - 600 cm <sup>-1</sup>
<b>1.002</b>	starke charakteristische Bande für mono-, meta- und 1,3,5-trisubstituierte Aromaten	~1.000 cm <sup>-1</sup>
758	aromatische C-H Deformationsschwingung (out of plane) (δCH)	900 cm <sup>-1</sup> bis 670 cm <sup>-1</sup>

Die Behandlung der Polymeroberflächen mit Selektionspuffer als auch mit den angereicherten Aptameren aus der *in vitro* Selektion bewirkten keine mit diesen physikalisch-chemischen Analysemethoden detektierbaren Veränderungen in der chemischen Oberflächenkomposition. Die atomaren Anteile von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff waren konsistent und es wurden keine nennenswerten Spuren von Elementen wie Schwefel aus dem Biotin oder Phosphor aus dem DNS Rückgrat detektiert. Ebenso traten im Rahmen der Raman Spektroskopie keine neuen Molekülschwingungen in Erscheinung, welche auf die Anwesenheit von DNS hindeuten würden.

Im direkten Vergleich wiesen alle verwendeten Polymerfilme hinsichtlich ihrer Benetzungseigenschaften eine vergleichbare hydrophobe und homogene Oberfläche auf. (Tabelle 16) Der voranschreitende und zurückziehende Kontaktwinkel unbehandelter PEI-Filme war mit  $\Theta_{adv} = 87,2 \pm 1,4^\circ$  und  $\Theta_{rec} = 70,5 \pm 2,6^\circ$  nur geringfügig niedriger, als bei den beiden anderen Polymeren. (PS:  $\Theta_{adv} = 94,6 \pm 1,3^\circ$ ,  $\Theta_{rec} = 80,4 \pm 1,4^\circ$  und PEVA:  $\Theta_{adv} = 91,4 \pm 1,4^\circ$ ,  $\Theta_{rec} = 72,6 \pm 1,9^\circ$ ) Ebenso unterschied sich die resultierende Hysterese nicht. Bei der aus Kontaktwinkelmessungen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen ermittelten Oberflächenenergie  $\gamma$  der PS- und PEVA-Filme konnte mit  $\gamma_{PS} = 54,5 \pm 3,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $\gamma_{PEVA} = 54,4 \pm 4,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  kein Unterschied ermittelt werden. Demgegenüber wies PEI mit  $43,4 \pm 10,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  eine geringere Grenzflächenenergie, jedoch auch eine stärker ausgeprägte Standardabweichung auf. Dennoch variierte die Zusammensetzung von  $\gamma$  maßgeblich zwischen den drei Materialien. Bei PS wurde die Oberflächenenergie fast ausschließlich durch disperse Elemente vermittelt. Der durch polare Elemente vermittelte Anteil an  $\gamma$  war mit  $\gamma^p_{PEVA} = 4,0 \pm 1,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  bei PEVA mehr als verdoppelt und bei PEI mit  $\gamma^p_{PEI} = 9,2 \pm 3,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  im Vergleich zu PEVA nochmals um mehr als den Faktor zwei erhöht.

**Tabelle 16. Bestimmung der Kontaktwinkel, Oberflächenenergie sowie des Strömungspotenzials der in der *in vitro* Selektion verwendeten polymeren Biomaterialien.** (Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Kontaktwinkel: n = 20)

		Kontaktwinkel [°]		Oberflächenenergie [mN/m]			Strömungspotential	
		Wasser-Luft	Hexadecan-Wasser	$\gamma^p$	$\gamma^d$	$\gamma$	$\zeta$ at pH=7,4 [mV]	IEP ( $\zeta = 0$ ) [pH]
PEI	$\Theta_{adv}$	87,2 $\pm$ 1,4	142,4 $\pm$ 6,0	0,6 $\pm$ 0,2	49,4 $\pm$ 4,3	50,0 $\pm$ 4,1	-95	2,9
	$\Theta_{rec}$	70,5 $\pm$ 2,6	99,6 $\pm$ 7,3	9,2 $\pm$ 3,2	34,2 $\pm$ 14,0	43,4 $\pm$ 10,8		
	Hyst	16,7 $\pm$ 2,3	42,8 $\pm$ 7,3					
PS	$\Theta_{adv}$	94,6 $\pm$ 1,3	159,5 $\pm$ 5,4	0	47,3 $\pm$ 2,2	47,3 $\pm$ 2,2	-59	2,7
	$\Theta_{rec}$	80,4 $\pm$ 1,4	133,4 $\pm$ 4,2	1,4 $\pm$ 0,4	53,1 $\pm$ 4,0	54,5 $\pm$ 3,6		
	Hyst	14,1 $\pm$ 1,8	26,1 $\pm$ 5,9					
PEVA	$\Theta_{adv}$	91,4 $\pm$ 1,4	164,2 $\pm$ 4,6	0	54,5 $\pm$ 2,2	54,5 $\pm$ 2,2	-51	3,0
	$\Theta_{rec}$	72,6 $\pm$ 1,9	118,0 $\pm$ 6,1	4,0 $\pm$ 1,7	50,4 $\pm$ 5,7	54,4 $\pm$ 4,0		
	Hyst	18,8 $\pm$ 1,7	46,2 $\pm$ 6,7					

Die Veränderung der Oberflächenladung bei verschiedenen pH-Werten wurde ebenfalls mittels Strömungspotenzialmessungen für alle Materialien in nativem Zustand untersucht. Die Daten zeigten für alle Polymeroberflächen eine Verringerung von  $\zeta$  bei steigendem pH. Gleichmaßen war kein Plateau erkennbar und  $\zeta$  war stets  $< 0$  für alle getesteten pH-Werte. Bei physiologischem pH 7,4 wies das Zetapotenzial bei allen Polymerfilmen eine negative Nettoladung auf ( $\zeta_{PEVA} = -51 \text{ mV}$ ,  $\zeta_{PS} = -59 \text{ mV}$  und  $\zeta_{PEI} = -95 \text{ mV}$ ), welche bei PEI nahezu um den Faktor zwei stärker ausgeprägt war.

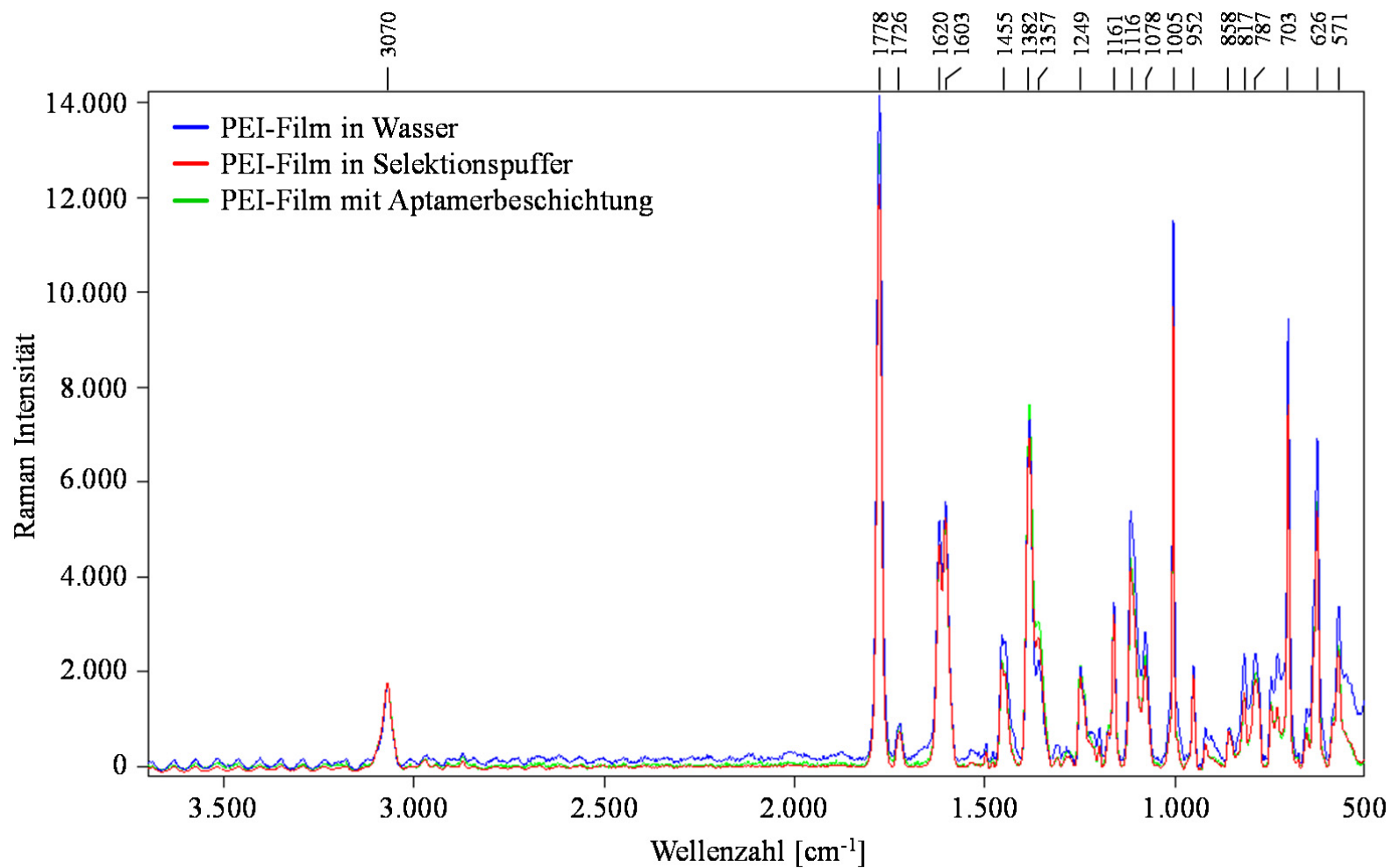


Abbildung 53. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PEI-Filmen in Wasser, Selektionspuffer und mit Aptamerbeschichtung. (Spektren der verschiedenen Bedingungen erhalten durch Mittelung aus bis zu 27 Einzelspektren des Raman Mappings)

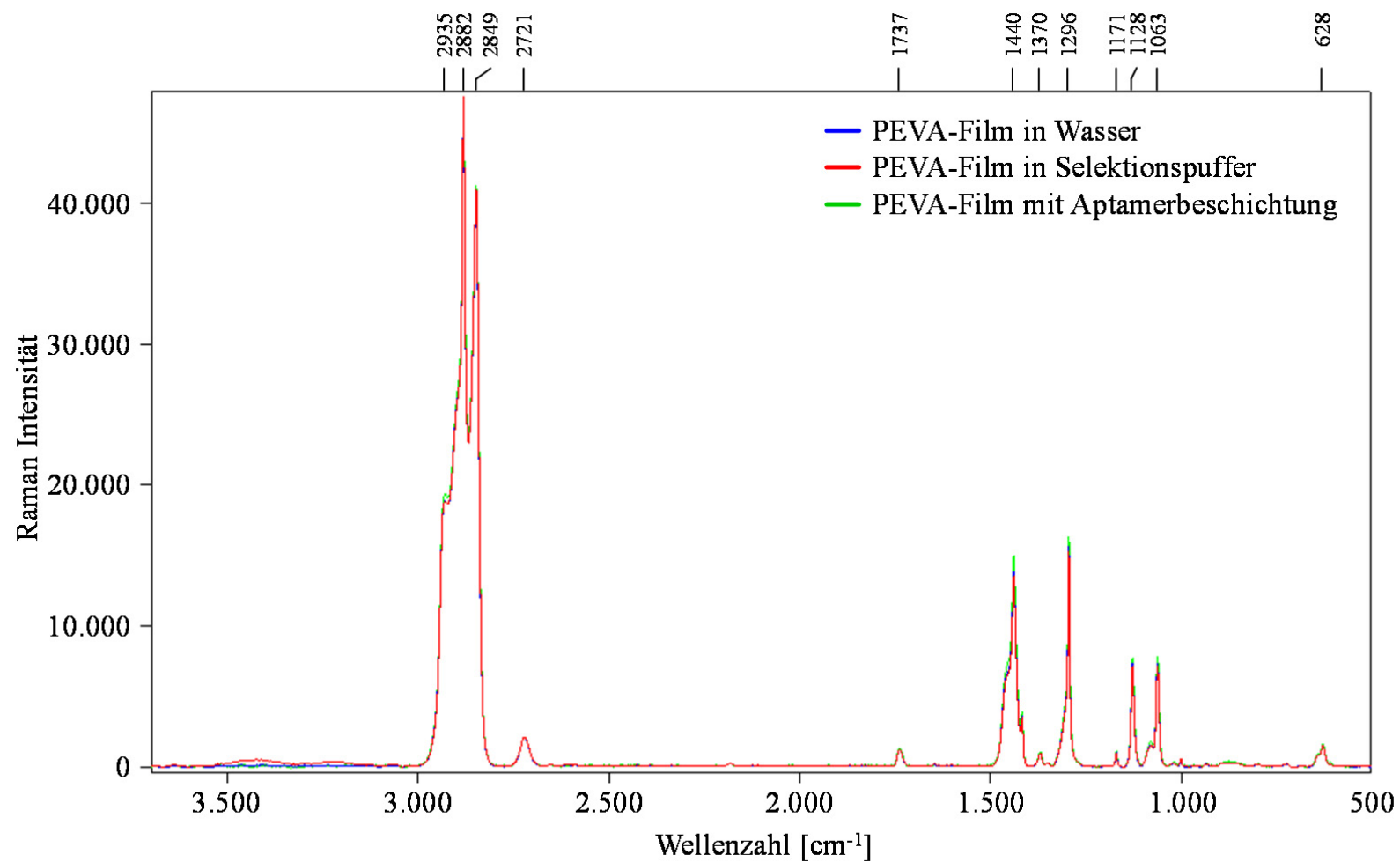


Abbildung 54. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PEVA-Filmen in Wasser, Selektionspuffer und mit Aptamerbeschichtung. (Spektren der verschiedenen Bedingungen erhalten durch Mittelung aus bis zu 27 Einzelspektren des Raman Mappings)

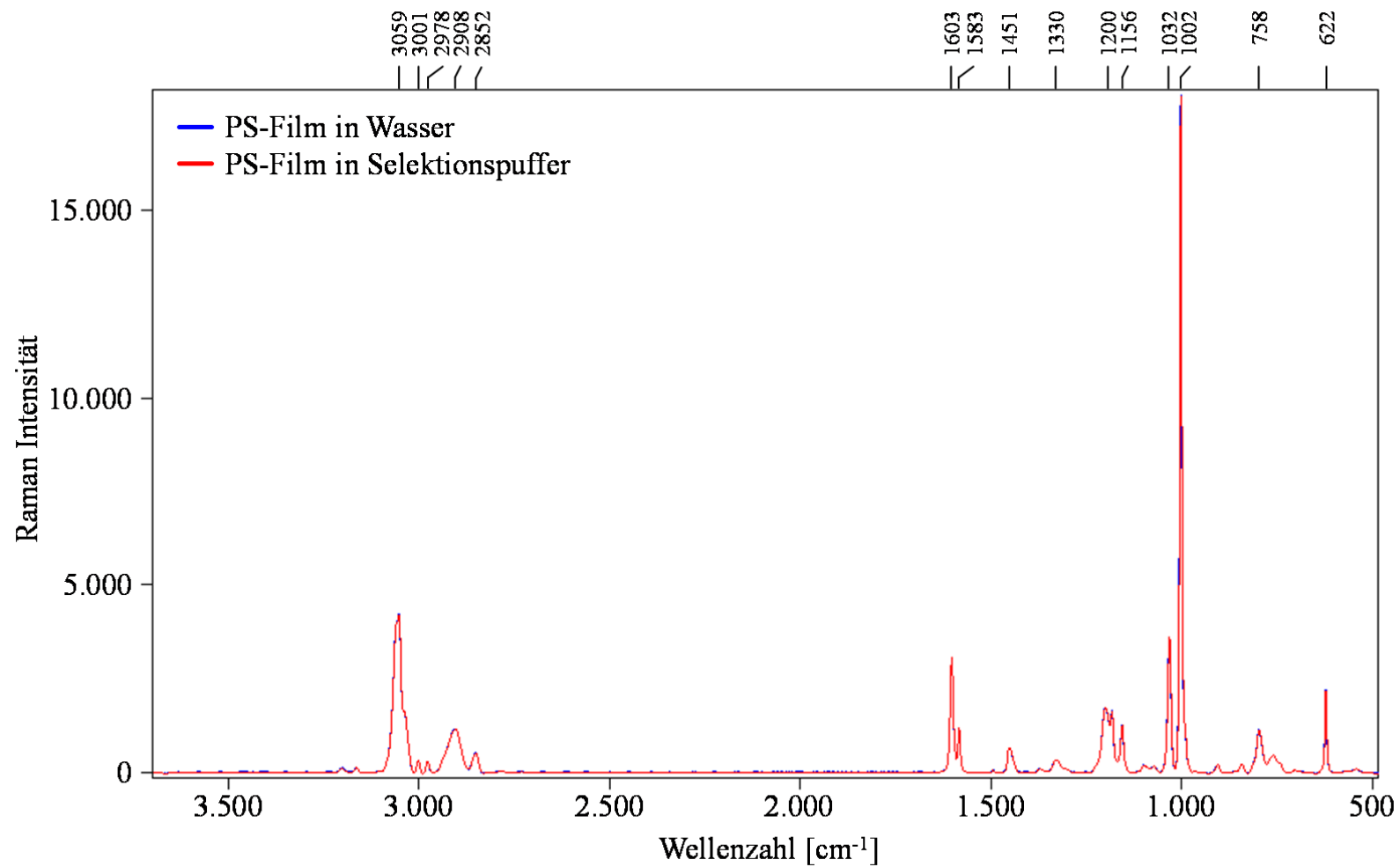


Abbildung 55. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PS-Filmen in Wasser und Selektionspuffer. (Spektren der verschiedenen Bedingungen erhalten durch Mittelung aus bis zu 27 Einzelspektren des Raman Mappings)

### 10.3. PCR-Optimierung für die *in vitro* Selektion gegen PEI-Filme

#### 10.3.1. Amplifizierbarkeit der Oligonukleotidbibliothek

Im ersten Schritt der PCR-Optimierung wurde die generelle Amplifizierbarkeit der generierten ssDNS-Bibliothek unter Standard PCR-Bedingungen überprüft. (Abbildung 56 & 57) Die Menge an Template im PCR-Ansatz wurde hierbei entsprechend einer für spätere Selektionsrunden angenommenen minimalen Ausbeute von schätzungsweise 2 pmol (1% Bindung an das Polymer) von initialen 200 pmol der Bibliothek gewählt. Für die Bestimmung des besten Verhältnisses zwischen Spezifität und Ausbeute wurde ebenfalls eine Zyklusoptimierung als essentieller Schritt der PCR-Amplifikation eingeführt. Dabei wurden einzelne PCR-Ansätze nach 10, 12, 14 und 16 Zyklen aus dem Cycler entnommen, der finalen Templateverlängerung (5 min, 72 °C) zugeführt und anschließend bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei 4 °C aufbewahrt.

#### PCR - Komponenten

ThermoPol Puffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer	3,0 µM
Taq - Polymerase (5 U/µl)	1,5 / 50 µl
DNS - Template	variabel

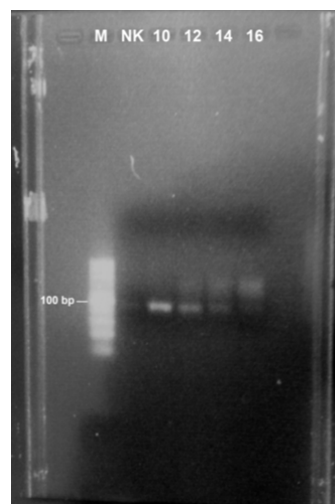
#### PCR - Programm

94 °C	5 min	} 10, 12, 14, 16 Zyklen
94 °C	30 s	
60 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	5 min	

**Abbildung 56.** Standard PCR-Bedingungen für die initialen Amplifikationsexperimente mit der ssDNS-Bibliothek für die *in vitro* Selektion gegen PEI-Film Oberflächen.

Das Ergebnis dieser ersten PCR zeigte auf dem Agarosegel eine starke Bande knapp unterhalb der 100 bp Bande des Längensstandards. Die kombinatorische ssDNS-Bibliothek war amplifizierbar, wobei das beste Verhältnis zwischen Spezifität und Ausbeute unter den gewählten PCR-Bedingungen nach 10 Zyklen zu erkennen war. (Abbildung 57) Bei einer Durchführung der PCR über mehr Zyklen wurde die Amplifikation zusehends unspezifischer und die gebildeten Produkte verschoben sich mehr hin zu größeren Amplifikaten.

**Abbildung 57. Nachweis der Amplifizierbarkeit der Bibliothek mit spezifischem Amplifikat bei ~100 bp nach 10 Zyklen.** (M = Längensstandard; NK = Negativkontrolle)

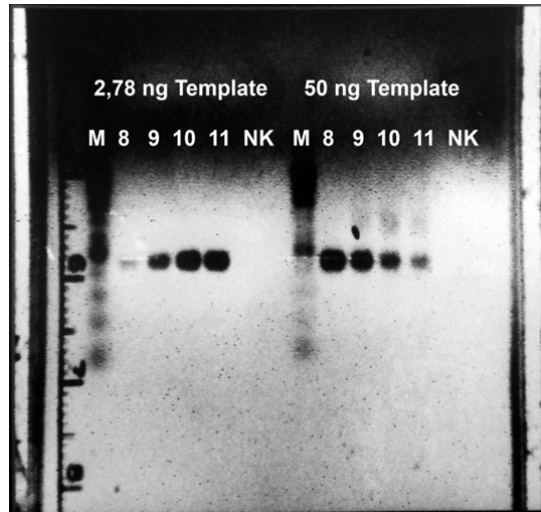


#### 10.3.2. Amplifizierung abhängig von der Templatemenge

Im zweiten Schritt der PCR-Optimierung wurde untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Mengen an Template auf die Amplifikation auswirken. Da aufgrund der Anreicherung spezifisch bindender Sequenzen an der Polymeroberfläche im Verlauf der *in vitro* Selektion mit steigenden Ausbeuten aus den Selektionsrunden zu rechnen war, war es entscheidend die Auswirkungen auf die Spezifität und Ausbeute der PCR zu untersuchen. Hierzu wurden vergleichende PCR Läufe mit unterschiedlichen Templatemengen im Bereich um 10 Zyklen (8 - 11) durchgeführt. Die Templatemengen in den PCR Ansätzen entsprachen einer zu erwartenden Ausbeute aus den Selektionsrunden von 1 bis 10%. (etwa 3 und 50 ng)

Im Ergebnis war auf dem Agarosegel für die beiden Templatemengen ein unterschiedlicher Verlauf der Amplifikation im Bereich zwischen 8 und 11 Zyklen zu erkennen. (Abbildung 58) Bei der geringeren Templatemenge wurde eine hohe und dabei spezifische Ausbeute der ssDNS-Bibliothek, wie im vorangegangenen Experiment, erst nach 10 bis 11 Zyklen erreicht. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei einer Templatemenge von 50 ng bereits früher nach 8 Zyklen erreicht, wobei die Spezifität der Amplifikation während der nachfolgenden Zyklen stark nachließ.

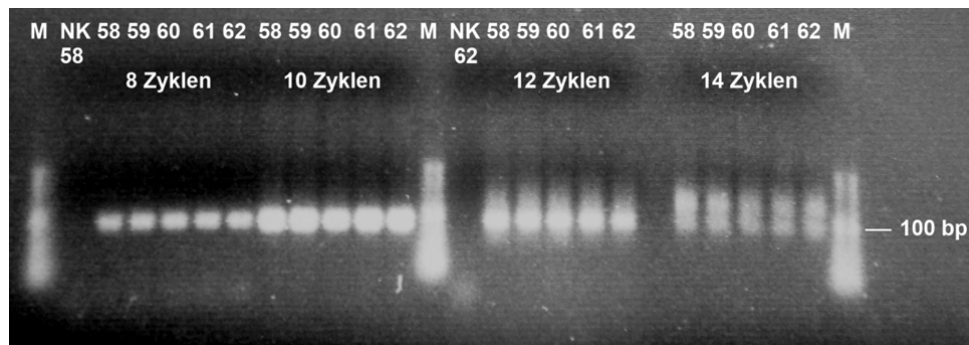
Da sich die Ausbeuten aus den einzelnen Selektionsrunden der späteren PEI-SELEX nicht pauschal bestimmen ließen, wurde für das spätere Selektionsprotokoll gegen die Oberfläche der PEI-Filme vor der präoperativen PCR stets eine Zyklenoptimierung durchgeführt, um die Zyklenzahl für das beste Verhältnis zwischen Ausbeute und Spezifität vorab zu bestimmen.



**Abbildung 58.** Untersuchung der Amplifikation verschiedener Templateausbeuten im Bereich von 1 - 10% der initialen Menge an ssDNS-Bibliothek einer Selektionsrunde.

### 10.3.3. Einfluss der Anlagerungstemperatur

Einen weiteren Optimierungsschritt stellte der Vergleich der Amplifikation bei leicht veränderten Anlagerungstemperaturen dar. Es wurde in einem Temperaturbereich von  $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht, ob diese Veränderungen sich auf die Spezifität und die Ausbeute der PCR auswirken. Hierbei wurde ebenfalls standardmäßig eine Zyklenoptimierung im Bereich von 8 bis 14 Zyklen mit in die Durchführung eingebracht und die Templatemenge pro PCR-Ansatz auf 3 ng festgelegt. Anhand der im Anschluss an die PCR durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese war zu erkennen, dass eine Veränderung der Anlagerungstemperatur im ausgewählten Bereich einen erkennbaren Einfluss auf die Amplifikation der ssDNS-Bibliothek entfaltet. (Abbildung 59) Die maximale Spezifität/Ausbeute wurde erneut nach 10 Zyklen erreicht und die Reaktion über weitere PCR-Zyklen hinweg zusehends unspezifisch.



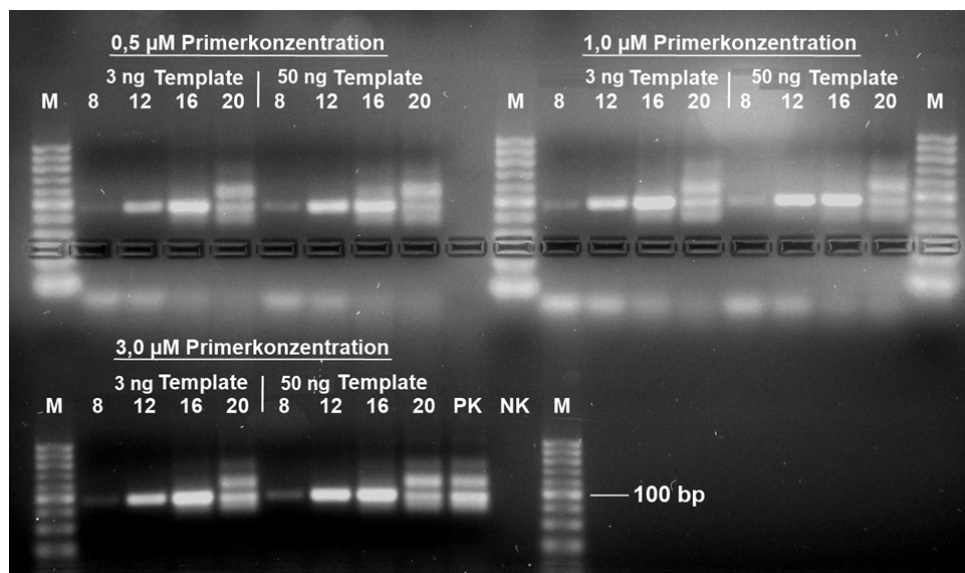
**Abbildung 59.** Auswirkungen variierender Annealing Temperaturen im Bereich von  $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  auf die Amplifikation der ssDNS-Bibliothek. (NK<sub>58/62</sub>: Negativkontrolle der flankierenden Annealingtemperaturen)



### 10.3.4. Primerkonzentration und Ausbeute

Der letzte Optimierungsschritt der PCR befasste sich mit der Erhöhung der Ausbeute. Bis zu diesem Zeitpunkt der PCR-Optimierung war die Amplifikation zwar spezifisch, jedoch lagen die Ausbeuten weit unterhalb der benötigten Stoffmengen für eine nachfolgende Selektionsrunde. Hierbei konnten bei den bisher verwendeten PCR-Bedingungen lediglich ~40 pmol an einzelsträngiger DNS aus einem PCR Mastermix Ansatz von 1 ml gewonnen werden. Diese Ausbeute war auf lange Sicht für die geplante *in vitro* Selektion unpraktikabel, da eine ausreichende Synthese enorme Mengen an Ressourcen und Zeit in Anspruch genommen hätte.

Nach intensiver Recherche, welche der PCR-Komponenten der limitierende Faktor bei der Amplifikation war, wurde eine zu geringe Primer Konzentration als mögliche Ursache ermittelt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden nach dem bereits etablierten Protokoll PCR-Experimente mit bis zur 10-fachen bisher verwendeten Primer Konzentrationen von 0,3  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Hierbei stellten Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  die maximal nutzbare Primer Menge dar.



**Abbildung 60.** Optimierung der PCR-Bedingungen hinsichtlich der Verwendung höherer Primerkonzentrationen (0,3 - 3,0  $\mu\text{M}$ ) zur Erhöhung der Ausbeute bei ausreichender Spezifität der Amplifikation.

Die gelelektrophoretische Analyse zeigte, dass im direkten Vergleich eine Erhöhung der Primerkonzentration keine sichtbaren Auswirkungen auf die Spezifität der Amplifikation entfaltete. Unabhängig von der Primerkonzentration als auch von der Menge an Template wurde nach gleicher Zyklenzahl (3 ng Template nach 16 Zyklen und 50 ng Template nach 12 Zyklen) das beste Verhältnis zwischen Spezifität und Ausbeute erreicht. (Abbildung 60) Hinsichtlich der PCR-Ausbeute erhöhte sich diese durch Verwendung von 3  $\mu\text{M}$  Primer stark, so dass nach der Durchführung einer präoperativen PCR (1 - 1,5 ml Gesamtansatz) ausreichende Mengen ssDNS für die folgende Selektionsrunde zur Verfügung standen.

#### 10.4. Verringerung der Hintergrundbindung der kombinatorischen DNS-Bibliothek

Beide Kompetitoren zeigten in den Bindungsstudien, dass sie die Hintergrundbindung ab einer Konzentration von 50 µg/ml in etwa gleichem Maß reduzierten. Unter Verwendung einer effektiven Kompetitorkonzentration von 100 µg/ml wurde die unspezifische Bindung unter 1% der angenommenen Minimalausbeute aus einer Selektionsrunde verringert. (Abbildung 61) Damit war eine ausreichende Inhibierung der unspezifischen Bindung gewährleistet und diese Kompetitor-konzentration wurde für die spätere SELEX beibehalten. Ebenso fiel die Entscheidung des Kompetitors auf die tRNS der Hefe, da RNS flexibler ist und dadurch mehr Konformationen für eine bessere Interaktion mit unspezifisch bindenden Sequenzen der Bibliothek einnehmen kann.

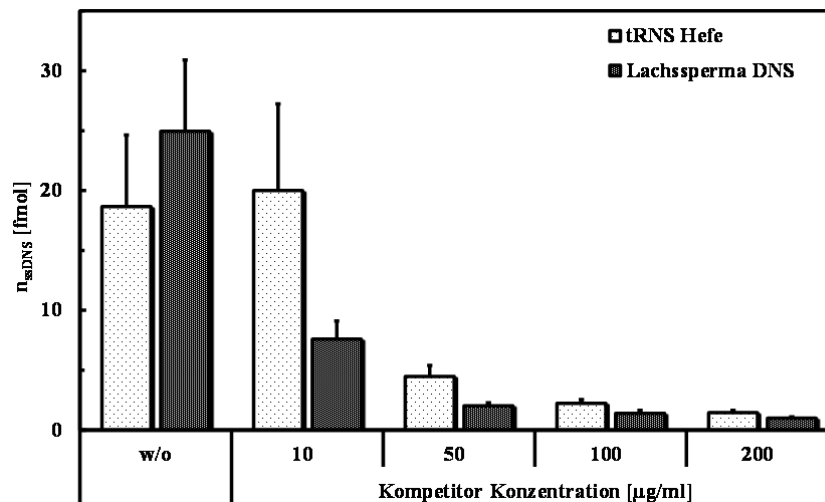


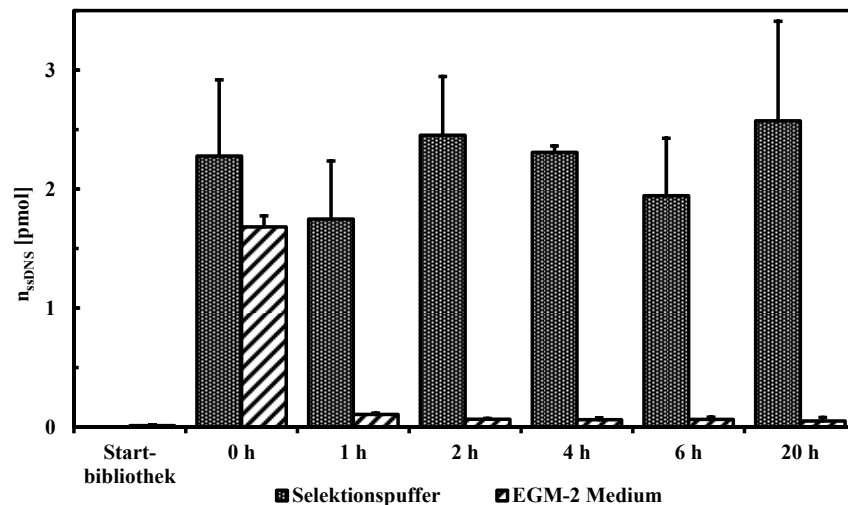
Abbildung 61. Verringerung der Hintergrundbindung der Selektionsbibliothek an PEI-Film unter Verwendung steigender Konzentrationen der Kompetitoren tRNS-Hefe sowie Lachssperma DNS. (Arithmetrischer Mittelwert ± Standardabweichung; n = 3)

#### 10.5. Untersuchung der Aptamerbindung unter Zellkulturbedingungen

Nach der Untersuchung, wie sich primäre humane Endothelzellen auf dem unbehandelten PEI-Film verhalten, war der nächste Schritt die Etablierung bzw. der Aufbau des zuvor angesprochenen Aptamer unterstützten Endothelialisierungssystems mittels nicht-kovalenter Immobilisierung eines zellbindenden Liganden. Hierfür war es unerlässlich, zunächst in Erfahrung zu bringen, ob - und wenn ja - inwieweit die Aptamerbindung an der Polymeroberfläche durch Zellkulturbedingungen beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden mehrere Bindungsstudien unter wechselnden Umgebungsbedingungen durchgeführt.

##### 10.5.1. Zeitlich abhängige Stabilität der Aptamer-Materialbindung

Im Rahmen der ersten Bindungsstudie wurde der zeitliche Einfluss auf die Bindung der angereicherten Aptamere unter Selektionsbedingungen in Selektionspuffer bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von maximal 20 h untersucht. Aus den Ergebnissen des quantitativen DNS-Nachweises wurde ersichtlich, dass die Aptamerbindung an der Polymeroberfläche über den gesamten Zeitraum des Experimentes stabil war. (Abbildung 62)

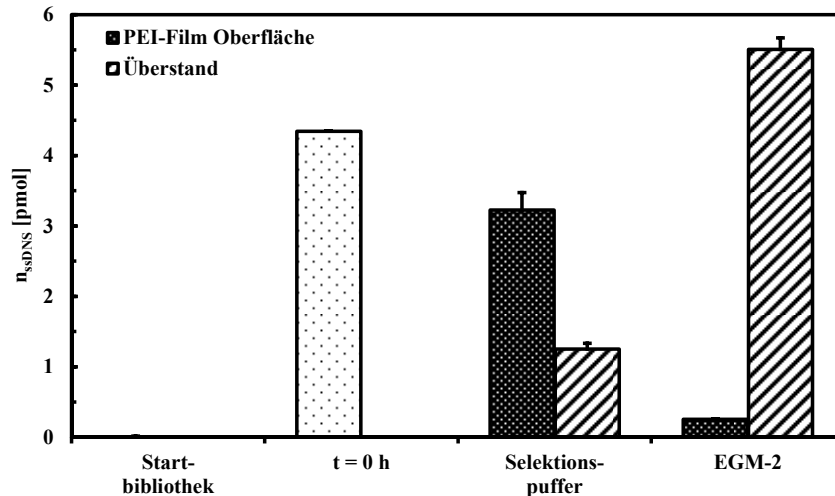


**Abbildung 62. Zeitlich abhängige Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme unter Selektions- und Zellkulturbedingungen.** Stabile Aptamerbindung an die PEI-Film Oberfläche über einen Zeitraum von 20 h unter Selektionsbedingungen, jedoch Verlust der Aptamerbindung in EGM-2 Medium. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

Nach der Validierung einer stabilen Aptamerbindung unter Selektionsbedingungen über einen Zeitraum von 20 h wurde diese ebenfalls unter Zellkulturbedingungen untersucht. Hierbei wurde zunächst die Aptamerbindung an die PEI-Filme nach dem etablierten Protokoll hergestellt (Bindungskontrolle bei  $t = 0$  h) und nachfolgend die beschichteten PEI-Stanzlinge in EGM-2 Medium überführt und im Brutschrank ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ vol-\% CO}_2$ ) inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aptamerbindung unter den gewählten Bedingungen innerhalb kurzer Zeit verloren ging. Bereits nach einer Stunde Inkubation war nur noch ein Bruchteil der initial vorhandenen Aptamere auf der PEI-Film Oberfläche nachweisbar. Diese befanden sich intakt und amplifizierbar im überstehenden Medium. Demnach waren an dieser Stelle weitere Bindungsexperimente nötig, um zu erörtern, welche der veränderten Umgebungsbedingungen - das Zellmedium oder die erhöhte Temperatur - für den Verlust der Aptamerbindung verantwortlich waren.

### 10.5.2. Stabilität der Aptamerbindung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in Zellkulturmedium

Das Ziel dieses Bindungsexperimentes war es herauszufinden, welche der im vorangegangenen Experiment veränderten Umgebungsbedingungen für den Verlust der Aptamerbindung verantwortlich waren. Mindestens eine der veränderten Bedingungen (Erhöhung der Temperatur auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder die Verwendung von Zellkulturmedium) musste hierbei einen störenden Einfluss auf die Aptamerbindung entfalten. Erneut wurden PEI-Film Stanzlinge nach dem Schritt der Aptamerbindung für einen Zeitraum von vier Stunden inkubiert. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Inkubationsbedingungen gewählt. Zum einen verblieben mehrere Aptamer beschichtete PEI-Stanzlinge in Selektionspuffer, wurden jedoch bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zum anderen wurden mehrere Stanzlinge in EGM-2 Medium überführt und für die Dauer der Inkubation bei RT gelagert. Nach Ablauf der Inkubation wurde nicht nur die verbliebene Menge an am Polymer gebundenen Aptamer, sondern auch die Menge im Überstand quantitativ bestimmt.

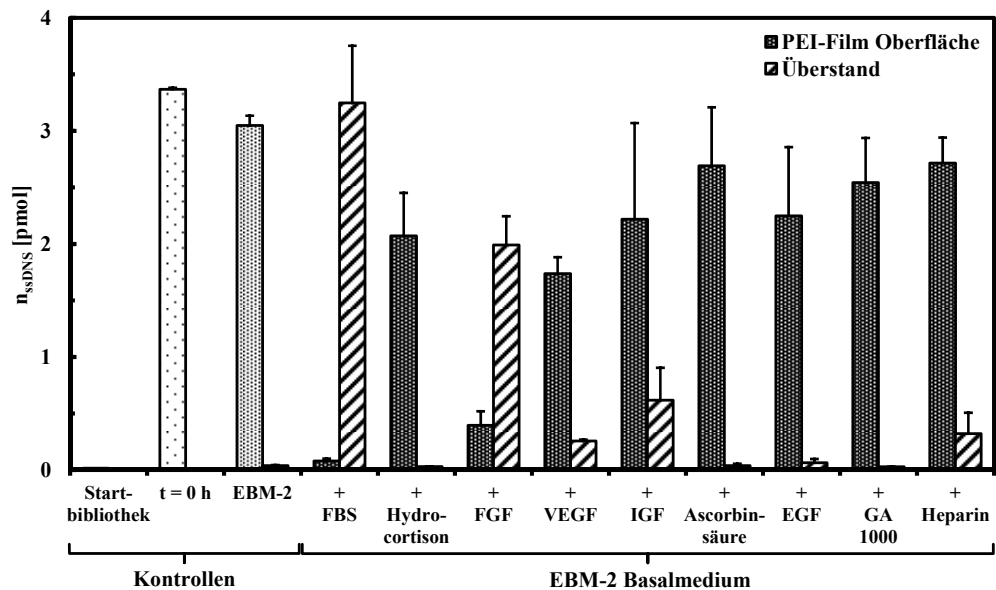


**Abbildung 63. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit in EGM-2 Medium bei RT sowie in Selektionspuffer bei 37 °C.** Starke Beeinflussung der Aptamerbindung durch das Zellkulturmedium. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

Die Ergebnisse der qPCR-Analyse offenbarten, dass eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37 °C keinen Einfluss auf die Affinität der Aptamerbindung hatte und ein Großteil der Aptamere nach wie vor auf dem PEI-Film und nicht im Überstand nachweisbar waren. (Abbildung 63) Im Gegensatz dazu waren nach der Inkubation auf den in EGM-2 inkubierten PEI-Stanzlingen nahezu keine Aptamere mehr nachweisbar. Diese befanden sich zum größten Teil intakt im überstehenden Medium.

### 10.5.3. Interferierender Einfluss des Zellmediums auf die Aptamer-PEI Bindung

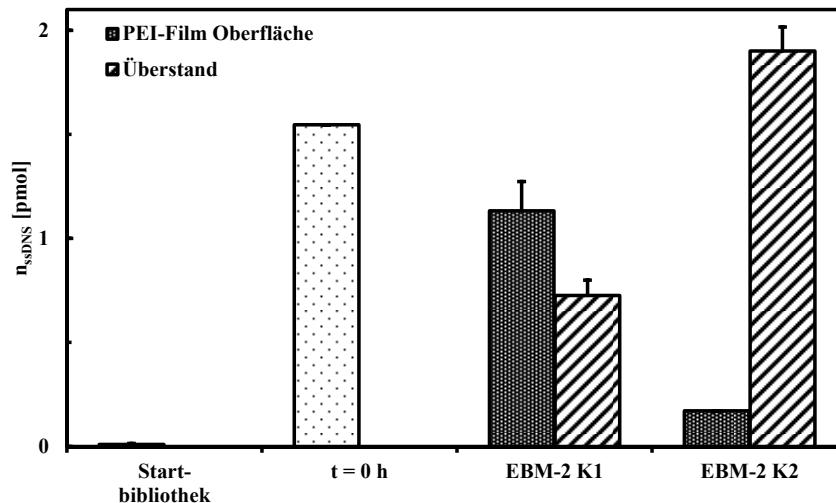
Anhand der letzten Ergebnisse war klar ersichtlich, dass das Medium oder einzelne Bestandteile einen interferierenden Einfluss auf die Aptamerbindung entfalten. Interferierend aus dem Grund, da die Aptamere nach wie vor intakt von der PEI-Film Oberfläche verdrängt wurden und fast gänzlich im Überstand nachweisbar waren. Da das EGM-2 Vollmedium aus dem Basalmedium EBM-2 und diversen nachfolgend hinzugegebenen Zusatzstoffen besteht, wurde in einer umfassenden Bindungsstudie das Basalmedium selbst, als auch jedes einzelne Supplement hinsichtlich eines interferierenden Einflusses auf die Aptamer-Materialbindung hin untersucht. (Abbildung 64) In diesem umfassenden Bindungsexperiment wurde ermittelt, dass das Basalmedium EBM-2 selbst keinen negativen Einfluss auf die Aptamerbindung besitzt. Jedoch vermittelten einige der im EGM-2 Medium enthaltenen Komponenten einen interferierenden Effekt auf die Aptamerbindung an PEI. Besonders ausgeprägt war dieser Einfluss beim zugegebenen Serum (FBS, engl.: *fetal bovine serum*) und dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF, engl.: *fibroblast growth factor*). Bei der Verwendung dieser Zusätze im Basalmedium waren auf den PEI-Filmen nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C nahezu keine Aptamere mehr nachweisbar. Ebenso zeigte sich beim endothelialen vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF, engl.: *vascular endothelial growth factor*) und beim Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF, engl.: *insulin-like growth factor*) ein, im Vergleich zu den zuvor genannten Komponenten, verminderter interferierender Effekt auf die Bindung der Aptamere.



**Abbildung 64. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit (4 h) bei 37 °C in EBM-2 Basalmedium + einzelne Zusatzstoffe.** Starke Beeinflussung der Aptamerbindung durch FBS und FGF sowie vermindert durch VEGF und IGF. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

#### 10.5.4. Aptamerbindung in den Mediumkompositionen EBM-2 K1 und K2

Mit dem Wissen, dass FBS, FGF, VEGF und IGF einen interferierenden Einfluss auf die Aptamer-Material Interaktion entfalten, wurden zwei Mediumkompositionen basierend auf dem EBM-2 Basalmedium kreiert. Die eine Komposition EBM-2 K1 beinhaltet alle Komponenten bis auf die vier oben genannten. EBM-2 K2 hingegen beinhaltet zusätzlich die weniger störenden Zusätze VEGF und IGF. Mit diesen Medien wurden weitere Bindungsexperimente durchgeführt und auch das Verhalten von primären HUVEC in diesen „Mangelmedien“ untersucht. Die Untersuchung der Aptamer-Materialbindung mit den Mediumkompositionen zeigte, dass EBM-2 K2 weiterhin einen starken interferierenden Einfluss besaß und nach der Inkubation, im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt  $t = 0$  h nur etwa 1/10 der Aptamere auf dem PEI-Film verblieben waren. (Abbildung 65) EBM-2 K1 hingegen beeinflusste die Aptamerbindung zwar noch immer, jedoch verblieb ein großer Teil der bindenden Sequenzen über den Inkubationszeitraum auf dem Polymer.

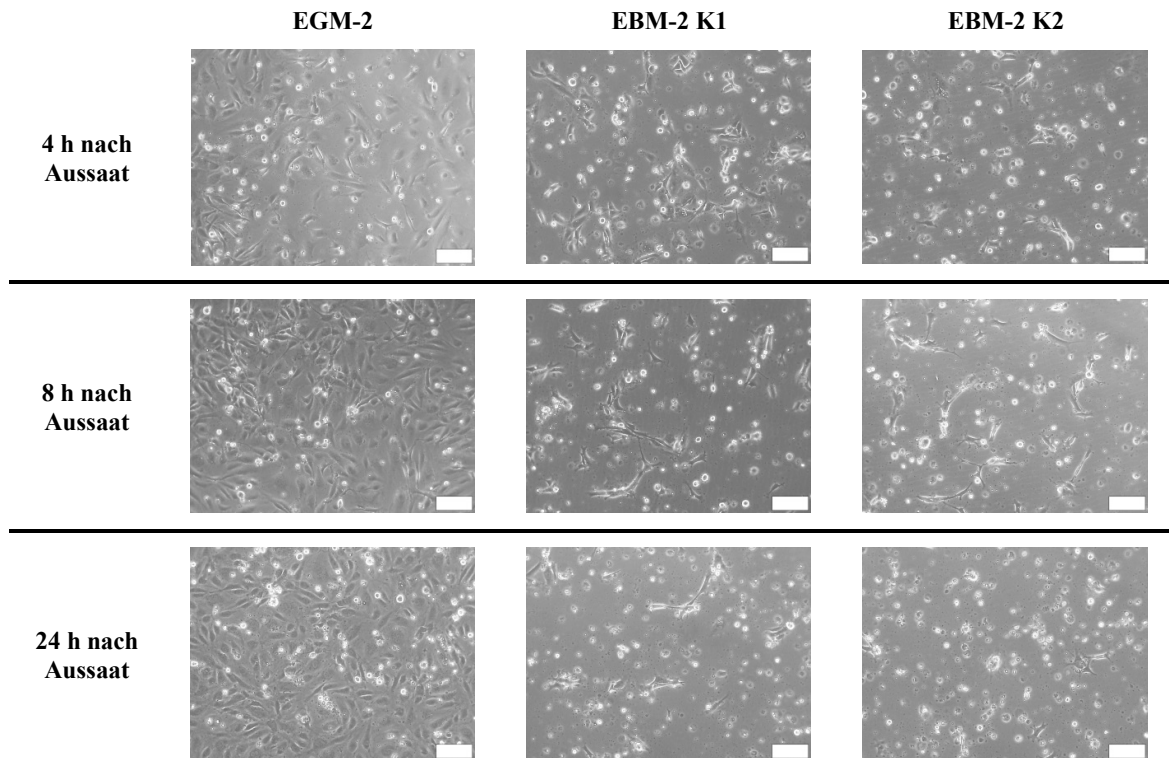


**Abbildung 65. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit (4 h) bei 37 °C in EBM-2 K1 und K2 Medium.** Starke Beeinflussung der Aptamerbindung durch EBM-2 K2, jedoch nur moderat durch EBM-2 K1. (Arithmetrischer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 6$ )

#### 10.5.5. Adhäsion und Morphologie primärer HUVEC in EBM-2 K1 und K2 Medium

Im Hinblick auf das zu Beginn angesprochene Ziel des Promotionsprojektes über multivalente physikalische Interaktionen bindende Aptamere für die Immobilisierung niedrigmolekularer zellbindender Liganden zu generieren, um diese für eine Verbesserung der initialen Adhärenz sowie Scherresistenz von Endothelzellen nach Aussaat auf polymeren Biomaterialien einzusetzen, war es notwendig das Verhalten der Zellen in den Medien zu untersuchen, in denen nachweislich eine stabile Aptamerbeschichtung vorhanden war. Aus diesem Grund wurden HUVEC in den beiden Mangelmedien auf TCP ausgesät. Die initiale Zelladhäsion und -morphologie wurden über einen Zeitraum von 24 h beobachtet und mit dem Zellwachstum unter Standardzellkulturbedingungen (EGM-2 Vollmedium) verglichen.

Die mikroskopischen Aufnahmen offenbarten, dass sich bereits vier Stunden nach der Aussaat im EGM-2 Medium ein dichter Monolayer aus adhären Endothelzellen gebildet hatte. (Abbildung 66) Bei den beiden Mangelmedien hingegen waren zum selben Zeitpunkt nur vergleichsweise wenige Zellen adhären. Über die Zeit bis 24 h nach der Aussaat formte sich im Vollmedium ein vollständig geschlossener endothelialer Monolayer, wohingegen die Anzahl adhärenter Zellen bei den Mangelmedien abnahm und eine große Anzahl von Zellen abgelöst im Überstand schwamm. Morphologisch war bei allen Medien stets eine vorrangig auftretende Spindelform der Zellen zu erkennen, welche auf eine starke Migration der Zellen hindeutet, wie sie bei der Entstehung der endothelialen Zellschicht typisch ist. Fakt ist, dass die Endothelzellen in den modifizierten Zellkultursystemen in der kurzen Zeit keinen geschlossenen Zellrasen bilden konnten.



**Abbildung 66. Adhäsion und Morphologie primärer HUVEC 4, 8 und 24 h nach konfluenter Aussaat auf TCP in EBM-2 K1 und K2 Medium im Vergleich zu EGM-2 Vollmedium als Kontrolle. Starke Beeinflussung des Zellwachstums durch die Mangelmedien EBM-2 K1 und K2. (Aussaat  $4 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>; Bilddokumentation mittels Lichtmikroskop im Phasenkontrast mit 5x und 10x Primärvergrößerung; Maßstab: 100 µm)**

---

## **ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS**

Abbildung 1.	Schematische Darstellung der Verbesserung der Scherresistenz des Endothelzellmonolayers durch Oberflächenbeschichtung der Biomaterialoberfläche mit adhäsiven und/oder wachstumsfördernden Faktoren. ....	5
Abbildung 2.	Schematische Übersicht der ligandenbasierten Strategien zur Verbesserung der Endothelialisierung von Biomaterialoberflächen. ....	6
Abbildung 3.	Aufbau der kombinatorischen Nukleinsäurebibliothek. ....	15
Abbildung 4.	Schematische Darstellung des SELEX-Prinzips. ....	16
Abbildung 5.	Chemische Struktur des technischen Polymers PEI-Ultem® 1000. ....	18
Abbildung 6.	Schematische Übersicht des Mechanismus der Aptamer-PEI Interaktion. ....	26
Abbildung 7.	Strategische Vorgehensweise bei der Umsetzung des Dissertationsvorhabens. ....	30
Abbildung 8.	Prozessierung der Polyetherimid Filme aus Pellets des PEI ULTEM® 1000. ....	33
Abbildung 9.	Schematische Darstellung des Trocknungsprozesses der PEI-Filme zwecks Evaporation des Lösungsmittels DCM aus dem polymeren Material. ....	33
Abbildung 10.	Experimentelles Setup der dynamischen Tropfenkonturanalyse mittels Captive-Bubble-Methode. ....	40
Abbildung 11.	Experimenteller Aufbau (A) und Funktionsprinzip (B) der rheologischen Untersuchung mittels derer die Scherresistenz des Endothelzelllayers auf glatten PEI-Filmen untersucht wurde. ....	46
Abbildung 12.	Experimentelles Setup des dynamischen Wachstumsmodells. ....	47
Abbildung 13.	Standard PCR-Reaktionsansatz und Amplifikationsbedingungen für die in der <i>in vitro</i> Selektion gegen PEI-Film Oberflächen verwendete ssDNS-Bibliothek. ....	50
Abbildung 14.	Exemplarische Darstellung und Auswertung eines qPCR-Laufes. ....	54
Abbildung 15.	Basensequenz der DNS-Startbibliothek und der korrespondierenden Primer. ....	56
Abbildung 16.	Prinzip der hexagonalen Kreisgitterpackung als Grundlage zur Berechnung der Anzahl bindender DNS-Moleküle für eine maximale Flächenbelegung. ....	57
Abbildung 17.	Raman Spektrum der PEI-Filme. ....	68
Abbildung 18.	Atomare Oberflächenzusammensetzung der PEI-Filme. ....	70
Abbildung 19.	Oberflächenstrukturen auf PEI-Filmen. ....	71
Abbildung 20.	L929-Fibroblasten 48 h nach Aussaat auf TCP in Zellkulturmedium sowie einem unverdünnten 72h-Extrakt des PEI-Films. ....	73
Abbildung 21.	LDH Aktivität im extrazellulären Medium (links) und metabolische Aktivität der L929-Fibroblasten (rechts) 48 h nach Aussaat in purem Zellkulturmedium (Kontrolle) und 72h-Extrakt des PEI-Films. ....	73
Abbildung 22.	Primäre HUVEC 48 h nach der Aussaat auf glatten PEI-Filmen (rechts) und TCP als Wachstumskontrolle (links). ....	74
Abbildung 23.	LDH Aktivität im Zellkulturüberstand (links) und metabolische Aktivität der HUVEC (rechts) 48 h nach Aussaat auf glatten PEI-Filmen sowie TCP als Wachstumskontrolle. ....	74
Abbildung 24.	Vitalität und Ausbildung des HUVEC-Layers zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat. Initial wurden $3 \cdot 10^4$ Zellen auf PEI-Filmen (15 mm Stanzlinge) sowie TCP als Wachstumskontrolle ausgesät. ....	75
Abbildung 25.	Zelldichte von HUVEC nach Aussaat auf PEI und TCP als Kontrolle für einen Zeitraum von maximal elf Tagen. ....	76
Abbildung 26.	Fluoreszenzfärbung des Aktin Zytoskeletts (rot), des fokalen Adhäsionsproteins Vinkulin (grün) sowie der genomischen DNS (blau) von HUVEC 48 h nach der Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle. ....	76
Abbildung 27.	Vasoaktive und pro-inflammatorische Mediatoren wurden bis zu elf Tage nach der Aussaat von HUVEC auf PEI-Filmen und TCP als Kontrolle mittels ELISA im Überstand quantifiziert. ....	78
Abbildung 28.	HUVEC-Monolayer Formierung neun Tage nach der Aussaat auf PEI-Filmen sowie Glas als Kontrolle jeweils vor und nach Exposition von venösem Scherstress. ....	80
Abbildung 29.	HUVEC Zelldichte nach maximal neuntägiger Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle vor und nach der Exposition venösen Scherstresses. ....	80



Abbildung 30. Prozentuale Darstellung des Zellverlustes nach der Exposition physiologischen Scherstresses. ....	80
Abbildung 31. HUVEC Zytoskelett und fokale Adhäsionen neun Tage nach der Aussaat auf PEI-Filmen und Glas als Kontrolle jeweils vor und nach der Scherung. ....	81
Abbildung 32. Vasoaktives Prostazyklin (PGI2) (A) und Thromboxan A2 (TXA2) (B) wurden vor [--] und nach [++] der Scherung mittels ELISA aus dem Überstand quantifiziert. ....	82
Abbildung 33. Sekretionsprofile pro-inflammatorischer Zytokine Interleukin-6 (IL-6) (A) und Interleukin-8 (IL-8) (B) quantifiziert aus Überständen mittels ELISA vor [--] und nach [++] dem Anlegen von Scherkräften. ....	83
Abbildung 34. Ergebnisse der Überwachung des Selektionsfortschrittes mittels qPCR. ....	84
Abbildung 35. Veränderung der Oberflächenenergie nach Aptamerbindung auf PEI-Filmen. ....	86
Abbildung 36. Visuelle Evaluation der verstärkten PEI-Film Bindung von AlexaFlour647-modifizierten Aptameren der PEI-SELEX Runde elf. ....	87
Abbildung 37. Hochauflösende Darstellung AlexaFlour647-modifizierter Aptamere auf PEI-Filmen. ....	88
Abbildung 38. Größenverteilung aggregierter AlexaFlour647-modifizierter Aptamere in Lösung. ....	88
Abbildung 39. Bindungstest angereicherter Aptamere aus Selektionsrunde elf der PEI-SELEX in Abhängigkeit von mono- und divalenten Kationen. ....	90
Abbildung 40. Test auf selektive Materialbindung der angereicherten Aptamere aus Selektionsrunde elf der PEI-SELEX. ....	90
Abbildung 41. Ergebnis der Sequenzierung angereicherter Aptamere der PEI-SELEX Runde elf. ....	92
Abbildung 42. Simulation der 2D-Struktur der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4. ....	93
Abbildung 43. Sequenzvergleich der Aptamerkandidaten PEI-1 - 4. Alignment der vier häufigsten Bindungsmotive der PEI-SELEX. (A) Nukleotide farblich nach Basen und (B) nach Purin/Pyrimidin kodiert. ....	93
Abbildung 44. Bindungsexperimente der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4 auf PEI-Filmen in Relation zur angereicherten und der Startbibliothek. ....	94
Abbildung 45. Bindungsexperiment äquimolarer Mischungen der Aptamerkandidaten PEI-1 bis -4 auf PEI-Filmen im Vergleich zur angereicherten und der Startbibliothek. ....	94
Abbildung 46. Bindung angereicherter Aptamere aus SELEX Runde elf an PEI-Filme in Anwesenheit verschiedener SAV-Lösungen. Die Aptamerbindung wurde konzentrationsabhängig von SAV mit BSA im Puffer negativ beeinflusst. Dieser Effekt trat bei BSA freiem SAV nicht auf. ....	96
Abbildung 47. Fluoreszenzintensitäten nach Bindung von AlexaFlour647 modifizierten Aptameren an PEI (links) sowie PE-SAV (mittig) und der AlexaFlour647/Biotin DNS-Sonde (rechts) an PEI gebundene biotinylierte Aptamere. ....	97
Abbildung 48. Vitalität und Adhärenz primärer HUVEC acht Stunden nach der Aussaat in EGM-2 Voll- und EBM-2 K1 Medium. Aussaat von HUVEC auf unbehandeltem sowie mit dem Aptamer-cRGD beschichteten PEI-Film und TCP als Wachstumskontrolle. ....	98
Abbildung 49. Zelldichte primärer HUVEC (▨ Anteil kugeligere Zellen; ■ Anteil ausgebreiteter Zellen) nach acht stündiger Aussaat in EGM-2 und EBM-2 K1 Medium auf unbehandelten sowie mit Aptamer-cRGD funktionalisierten PEI-Filmen und TCP als Kontrolle. ....	100
Abbildung 50. Exemplarische Bilder der initialen Endothelzelladhärenz 8 h nach Aussaat in EBM-2 K1 Medium auf nativen sowie mit Aptamer-cRGD funktionalisierten PEI-Filmen und Glas als Kontrolle. ....	100
Abbildung 51. Zelldichte primärer HUVEC nach acht stündiger Aussaat in EBM-2 K1 Medium auf unbehandelten sowie mit dem Aptamer-cRGD System funktionalisierten PEI-Filmen und Glas als Kontrolle vor und nach der Exposition venöser Scherkräfte. ....	100
Abbildung 52. Interaktionsmöglichkeiten der verwendeten Polymere für nicht-kovalente WW mit Nukleinsäurebasen. ....	113
Abbildung 53. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PEI-Filmen in Wasser, Selektionspuffer und mit Aptamerbeschichtung. ....	136
Abbildung 54. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PEVA-Filmen in Wasser, Selektionspuffer und mit Aptamerbeschichtung. ....	137
Abbildung 55. Vergleichende Überlagerung der Raman Spektren von PS-Filmen in Wasser und Selektionspuffer. ....	138

Abbildung 56. Standard PCR-Bedingungen für die initialen Amplifikationsexperimente mit der ssDNS-Bibliothek für die <i>in vitro</i> Selektion gegen PEI-Film Oberflächen. ....	139
Abbildung 57. Nachweis der Amplifizierbarkeit der Bibliothek mit spezifischem Amplifikat bei ~100 bp nach 10 Zyklen. ....	139
Abbildung 58. Untersuchung der Amplifikation verschiedener Templateausbeuten im Bereich von 1 - 10% der initialen Menge an ssDNS-Bibliothek einer Selektionsrunde. ....	140
Abbildung 59. Auswirkungen variierender Annealing Temperaturen im Bereich von $60 \pm 2$ °C auf die Amplifikation der ssDNS-Bibliothek. ....	140
Abbildung 60. Optimierung der PCR-Bedingungen hinsichtlich der Verwendung höherer Primerkonzentrationen (0,3 - 3,0 $\mu$ M) zur Erhöhung der Ausbeute bei ausreichender Spezifität der Amplifikation. ....	141
Abbildung 61. Verringerung der Hintergrundbindung der Selektionsbibliothek an PEI-Film unter Verwendung steigender Konzentrationen der Kompetitoren tRNS-Hefe sowie Lachssperma DNS. ....	142
Abbildung 62. Zeitlich abhängige Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme unter Selektions- und Zellkulturbedingungen. ....	143
Abbildung 63. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit in EGM-2 Medium bei RT sowie in Selektionspuffer bei 37 °C. ....	144
Abbildung 64. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit (4 h) bei 37 °C in EBM-2 Basalmedium + einzelne Zusatzstoffe. ....	145
Abbildung 65. Stabilität der Bindung angereicherter Aptamere an PEI-Filme über die Zeit (4 h) bei 37 °C in EBM-2 K1 und K2 Medium. ....	146
Abbildung 66. Adhäsion und Morphologie primärer HUVEC 4, 8 und 24 h nach konfluenter Aussaat auf TCP in EBM-2 K1 und K2 Medium im Vergleich zu EGM-2 Vollmedium als Kontrolle. ....	147

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. Chemische Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften des technischen Polymers PEI-Ultem <sup>®</sup> 1000.].....	18
Tabelle 2. Oberflächenspannung der verwendeten Lösungsmittel. ....	41
Tabelle 3. Eingesetzte DNS Stoffmengen im Verhältnis zur angebotenen PEI-Film Oberfläche für die einzelnen Selektionszyklen. ....	57
Tabelle 4. Übersicht der Veränderungen des Selektionsprotokolls zur Steigerung der Stringenz innerhalb der PEI-SELEX. ....	61
Tabelle 5. Zuordnung der Molekülschwingungen aus den Raman Spektren der PEI-Filme. ....	70
Tabelle 6. Atomare Oberflächenzusammensetzung nativer PEI-Filme. ....	70
Tabelle 7. Topographie nativer PEI-Filme in Wasser bestimmt mit AFM. ....	71
Tabelle 8. Ergebnisse der Strömungspotenzial und Kontaktwinkelmessungen sowie der daraus kalkulierten Oberflächenenergie nativer PEI-Filme. ....	72
Tabelle 9. Topographie nativer PEI-Filme bestimmt mit optischer Profilometrie. ....	72
Tabelle 10. Topographie der PEI-Filme unter Selektionsbedingungen und nach der Aptamerbindung im Vergleich zur nativen Polymeroberfläche. ....	85
Tabelle 11. Kontaktwinkel und Oberflächenenergie Aptamer behandelte PEI-Filme. DNA behandelte PEI-Filme im Vergleich zu nativem und mit Selektionspuffer inkubiertem Polymer. ....	86
Tabelle 12. Topographie verwendeter polymerer Biomaterialien vergleichend bestimmt mittels AFM und optischer Profilometrie. ....	133
Tabelle 13. Mittels XPS analysierte atomare Oberflächenzusammensetzung verwendeter polymerer Biomaterialien. ....	133
Tabelle 14. Zuordnung der Schwingungen aus den Raman Spektren der PEVA-Filme. ....	134
Tabelle 15. Zuordnung der Schwingungen aus den Raman Spektren der PS-Filme. ....	134
Tabelle 16. Bestimmung der Kontaktwinkel, Oberflächenenergie sowie des Strömungspotenzials der in der <i>in vitro</i> Selektion verwendeten polymeren Biomaterialien. ....	135

---

## **PUBLIKATIONEN**

**C. Schulz**, M. Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Viability and function of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 52(2-4), (2012), 267-82

F. Jung, **C. Schulz**, F. Blaschke, D. Müller, C. Mrowietz, R.P. Franke, A. Lendlein and W.-H. Schunck, Effect of cytochrome P450-dependent epoxyeicosanoids on Ristocetin-induced thrombocyte aggregation, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 52(2-4), (2012), 403-16

**C. Schulz**, M. von Rüsten-Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Adherence and shear-resistance of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 57, (2014), 147-58

T. Roch, **C. Schulz**, N. Ma, F. Jung and A. Lendlein, Interaction of poly(ether imide) films with early immune mechanisms, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 57, (2013),203-12

A. Krüger, A. Mayer, T. Roch, **C. Schulz**, A. Lendlein and F. Jung, Angiogenically stimulated alternative monocytes maintain their pro-angiogenic and non-inflammatory phenotype in long-term co-cultures with HUVEC, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 58, (2014), 229-40

---

## **POSTER**

**C. Schulz**, M. Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Viability and function of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, (2012), 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Halle, Germany

**C. Schulz**, M. von Rüsten-Lange, A. Krüger, F. Jung and A. Lendlein, Biological evaluation of smooth, hydrophobic poly(ether imide) films for aptamer supported endothelialization, (2014), Polydays 2014, Berlin, Germany

## **VORTRÄGE**

**C. Schulz**, M. von Rüsten-Lange, A. Krüger, A. Lendlein and F. Jung, Adherence and shear-resistance of primary human endothelial cells on smooth poly(ether imide) films, (2013), 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Dresden, Germany

**C. Schulz**, Biological Evaluation of very Smooth, Hydrophobic Poly(ether imide) Films for Endothelialization, Summer School 2013, Helmholtz Graduate School for Macromolecular Bioscience

## **PREISE UND AUSZEICHNUNGEN**

Best presentation award, Summer School 2013, Helmholtz Graduate School for Macromolecular Bioscience

---

## **DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Lendlein für die Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung dieser Dissertation sowie seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens gilt mein Dank ebenso Frau Prof. Dr. Nan Ma.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Abteilungsleiter und Mentor Prof. Dr. Friedrich Jung der mich auch in schwierigen Momenten stets wieder aufgebaut hat und bestärkte an den Erfolg zu glauben.

Der Helmholtz-Zentrum Geesthacht – Zentrum für Material- und Küstenforschung GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung der Promotion und die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Biomaterialforschung anzufertigen.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung BIE sowie des gesamten Institutes für das stets angenehme und unterhaltsame Arbeitsklima, die vielen angeregten Diskussionen, die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit außerhalb des Laboralltags.

Für die Sequenzierung der unzähligen Sequenzmotive danke ich Dr. Jochen Hecht. Ohne seinen Einsatz und die wochenlange Analyse der Motive wäre die Beendigung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Dr. Anne Krüger, Dr. Steffen Braune und Dr. Toralf Roch danke ich für ihre Geduld in vielen teils auch hitzigen Diskussionen und den ein oder anderen Anstoß in die richtige Richtung, um diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Zuletzt, jedoch am allermeisten möchte ich meiner Familie für ihren immer währenden Rückhalt danken. Ihre Unterstützung in dieser mitunter sehr schwierigen Zeit war grenzenlos und sie waren mir immer ein Zuhause, wie ich mir kein Besseres wünschen könnte. Durch ihren Glauben an mich haben auch sie einen großen Anteil an dieser Arbeit.

---

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

---

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

