

# **Aptamervermittelter Wirkstofftransport**

*Aptamer mediated Drug Delivery*

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

***Dr. rer. nat.***

Am Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von Dipl. Chem.

**Sven Kruspe**

aus Hamburg

Hamburg, 2014



Die vorgelegte Arbeit wurde von Oktober 2010 bis August 2014 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn

Herr Prof. Dr. Reinhard Bredehorst

Tag der Disputation: 17. Oktober 2014



*Allen, die mir beigestanden, mich unterstützt, mir geholfen und an mich geglaubt haben.*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- 1) S. Kruspe, C. Meyer, U. Hahn, Chlorin e6 conjugated interleukin-6 receptor aptamers selectively kill target cells upon irradiation, *Mol. Ther. Nucl. Acids* **2014**, 3, e143.  
doi:10.1038/mtna.2013.70
- 2) S. Kruspe, F. Mittelberger, K. Szameit, U. Hahn, Aptamers as drug delivery vehicles, *ChemMedChem* **2014**, 9, 1998-2011.  
doi: 10.1002/cmdc.201402163
- 3) S. Kruspe, U.Hahn, An aptamer intrinsically comprising the cytostaticum 5-Fluoro-2'-deoxy-uridine for targeted chemotherapy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 10541-10544.; Ein intrinsisch 5-Fluor-2'-desoxyuridin beinhaltendes Aptamer für die gezielte Chemotherapie, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 10711-10715.  
doi: 10.1002/anie.201405778 (englisch)  
doi: 10.1002/ange.201405778 (deutsch)



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Theoretischer Teil</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aptamere</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aptamere Selektion	2
1.1.2 Therapeutische Anwendung von Aptameren	3
1.1.3 Aptamere als Vehikel für den gerichteten Wirkstofftransport	5
1.1.4 Strategien des aptamervermittelten Transports verschiedener Wirkstoffklassen	7
<b>1.2 Interleukin 6 und der Interleukin-6-Rezeptor</b>	<b>12</b>
1.2.1 Interleukin-6 und Interleukin-6-Rezeptor als therapeutische Ziele	13
1.2.2 Interleukin-6-Rezeptor spezifische RNA-Aptamere AIR-3 und AIR-3A	15
<b>1.3 Photodynamische Therapie</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Therapeutisch wirksame Nukleosid-Analoga</b>	<b>18</b>
1.4.1 5-Fluoruracil und dessen Nukleosid-Derivate	20
<b>1.5 Analyse der atomaren Interaktionen in RNA-Protein-Komplexen</b>	<b>21</b>
1.5.1 Analyse von RNA-Protein-Interaktionen mittels kovalenter Verknüpfungen ( <i>cross linking</i> , XL)	21
1.5.2 Bevorzugte Wechselwirkungen in RNA-Protein-Interaktionen	24
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>27</b>
<b>3 Material</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Chemikalien</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Kits und Materialien</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Puffer, Medien und Lösungen</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Nukleotide</b>	<b>30</b>

3.4.1	Nukleosidtriphosphate	30
3.4.2	Oligonukleotide	30
<b>3.5</b>	<b>Längenstandards</b>	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Proteine</b>	<b>31</b>
3.6.1	Enzyme	31
3.6.2	Antikörper	31
3.6.3	Sonstige Proteine	32
<b>3.7</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>32</b>
<b>3.8</b>	<b>Apparative Materialien</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Verwendete Software</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden zur Synthese, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren</b>	<b>34</b>
4.1.1	<i>In vitro</i> -T7-Transkription	34
4.1.2	<i>In vitro</i> -T7-Transkription unter Verwendung modifizierter Nukleotide	35
4.1.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	35
4.1.4	Detektion von Nukleinsäuren	36
4.1.5	Reinigung von Nukleinsäuren mittels Diffusionselution aus PAA-Gelen	36
<b>4.2</b>	<b>Methoden zur RNA-Modifikation</b>	<b>37</b>
4.2.1	Radioaktive Markierung des 5'-Terminus mit <sup>32</sup> P-Phosphat	37
4.2.2	Fluoreszenzmarkierung des 3'-Terminus mit Alexa Fluor 647	38
4.2.3	Konjugation 3'-terminal amino-modifizierter RNA mit Chlorin e6	39
<b>4.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>40</b>
4.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.3.2	Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung	41
<b>4.4</b>	<b>Methoden zur Analyse von RNA-Molekülen und deren Interaktion mit Proteinen</b>	<b>41</b>
4.4.1	Bestimmung der Stabilität von RNA-Molekülen	41
4.4.2	Analyse von RNA-Protein-Interaktionen mittels Filterretentionsstudien	42
4.4.3	Cross Linking von Hyper-IL-6 mit radioaktiv markierter RNA	42
4.4.4	Methoden zur Fragmentierung von RNA	43
<b>4.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>44</b>
4.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	44
4.5.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien	46
4.5.3	<i>in vitro</i> -PDT	46
4.5.4	Aptamer vermittelte Aufnahme therapeutischer Nukleosid-Analoga	46

4.5.5	Durchflusszytometrische Analysemethoden	47
4.5.6	Fluoreszenzmikroskopische Analysemethoden	49
4.5.7	Proliferationsassay	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der Bindung von AIR-3A an die Zelllinie BaF3_gp130_hIL-6R_TNF<math>\alpha</math></b>	<b>52</b>
5.1.1	Quantifizierung der gebundenen AIR-3A Moleküle	52
5.1.2	Zeitlicher Verlauf des Bindungspotentials durch Rezeptorregeneration	53
5.1.3	Co-Lokalisation von internalisiertem AIR-3A	54
<b>5.2</b>	<b>Analyse der Bindung von AIR-3A an humanen Zelllinien</b>	<b>58</b>
5.2.1	Nachweis des hIL-6R auf humanen Zelllinien	58
5.2.2	Bindung von AIR-3A an die humane MM-Zelllinie KMS-12-BM	60
<b>5.3</b>	<b>AIR-3A vermittelte <i>in vitro</i>-PDT</b>	<b>61</b>
5.3.1	Konjugation von AIR-3A und Chlorin e6	61
5.3.2	Bindungsanalyse von AIR-3A-ce6 an hIL6R-präsentierende Zellen	62
5.3.3	Analyse der Aufnahme von AIR-3A-ce6 in hIL6R-präsentierende Zellen	64
5.3.4	AIR-3A-ce6 vermittelte Zytotoxizität in BaF3-Zellen (Aptamer vermittelte PDT)	67
5.3.5	Zytotoxizität von freiem Chlorin e6	70
<b>5.4</b>	<b>AIR-3 vermittelte Aufnahme der Cytostatika 5-Fluoruracil und 5-Fluor-2'-desoxyuridin</b>	<b>71</b>
5.4.1	Intrinsische Modifikation von AIR-3 mit 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin	71
5.4.2	Bindungsanalyse von 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3	72
5.4.3	Bindungsanalyse von 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3 an hIL-6R tragenden Zellen	75
5.4.4	Stabilität von 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3	77
5.4.5	Zytotoxische Wirkung des mit 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3 auf hIL-6R tragende Zellen	79
<b>5.5</b>	<b>Bindungsstellenanalyse mittels kovalenter Verknüpfung des RNA Aptamers mit dem Zielprotein Hyper-IL-6</b>	<b>82</b>
5.5.1	Cross Linking von AIR-3 bzw. AIR-3A an Hyper-IL-6	82
5.5.2	Fragmentierung der RNA des XL-Produktes mittels RNase A und Imidazol	85
5.5.3	Massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide des XL-Produktes	89
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>6.1</b>	<b>Bindung von AIR-3A auf der Zelloberfläche und dessen Internalisierung</b>	<b>93</b>
<b>6.2</b>	<b>Wirkstofftransport durch AIR-3A und AIR-3</b>	<b>96</b>
6.2.1	Aptamer vermittelte <i>in vitro</i> -PDT	97

6.2.2	Wirkstoff-Transport von 5-FUR und 5-FUdR	101
6.3	Analyse der Bindungsstelle von AIR-3A an hIL-6R	106
7	Ausblick	113
8	Literatur	117
9	Danksagung	137
10	Anhang	138
10.1	GHS-Verordnung	138
10.2	Sicherheitshinweise für Gefahrenstoffe	139
10.3	Gefahrenstoffinformationen	141
10.4	Liste der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. I & II	144
10.5	Eidesstattliche Erklärung	145
10.6	Lebenslauf	146

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der SELEX-Prozess. ....	2
Abbildung 2: Auswahl publizierter Aptamer-siRNA/shRNA-Konjugate. ....	7
Abbildung 3: Strukturen von Doxorubicin und dessen Derivaten. ....	9
Abbildung 4: Auswahl von Aptamer-Nanomaterial-Konjugaten. ....	10
Abbildung 5: Kristallstrukturen von hIL-6R und hIL-6. ....	12
Abbildung 6: Strukturmodell des Aptamers AIR-3A. ....	15
Abbildung 7: Jablonski-Diagramm der elektronischen Übergänge von Photosensibilisatoren. ....	17
Abbildung 8: Strukturen von Photosensibilisatoren Aptamer vermittelter PDT. ....	18
Abbildung 9: Nukleosid-analoge Inhibitoren viraler Polymerasen. ....	19
Abbildung 10: Nukleosid- und Nukleotid-Analoga in der Chemotherapie. ....	19
Abbildung 11. Metabolismus von 5-Fluoruracil. ....	20
Abbildung 12: Prominente UV- <i>cross-linking</i> -Produkte von Uracil bzw. Uridin. ....	23
Abbildung 13: Prominente UV-XL-Produkte von Guanin nach Oxidation zu 8-Oxoguanin. ....	23
Abbildung 14: EDC vermitteltes <i>Cross Linking</i> von RNA an Proteine. ....	24
Abbildung 15: Reaktionen der 3'-terminalen Fluoreszenzmarkierung. ....	38
Abbildung 16: Quantifizierung zellgebundener Aptamere mittels Durchflusszytometrie. ....	53
Abbildung 17 : Zeitlicher Verlauf der IL6-Rezeptorregeneration. ....	54
Abbildung 18: Co-Lokalisation von AIR-3A im frühem Endosom der Zelllinie BaF3_gp130_hIL-6R_TNF $\alpha$ . ....	55
Abbildung 19: Molekülstrukturen und Absorptionsspektren von AIPcS <sub>4</sub> und TPPS <sub>2a</sub> . ....	56
Abbildung 20: Subzelluläre Visualisierung der Fluoreszenzmarker AIPcS <sub>4</sub> und TPPS <sub>2a</sub> mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (kLSM). ....	57
Abbildung 21: Co-Lokalisation von AIR-3A mit TPPS <sub>2a</sub> mittels konfokaler Laser-Scanning- Mikroskopie (kLSM). ....	58
Abbildung 22: Nachweis des hIL-6R auf humanen MM-Zelllinien im Vergleich zur Zelllinie BaF3_gp130_hIL6R_TNF $\alpha$ . ....	59
Abbildung 23: Bindung von AIR-3A an Zellen der MM-Zelllinie KMS-12-BM. ....	60
Abbildung 24: Analysen von AIR-3A-ce6. ....	62
Abbildung 25: Bindung von AIR-3A-ce6 an BaF3-Zellen. ....	63

Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von AIR-3A-ce6 in hIL-6R positiven BaF3-Zellen.....	65
Abbildung 27: Stabilität von AIR-3A-ce6 unter sauren Bedingungen.....	66
Abbildung 28: Verbleib von Chlorin e6 in hIL-6R positive BaF3-Zellen. ....	67
Abbildung 29: Positivkontrollen zur durchflusszytometrischen Apoptosebestimmung. ....	68
Abbildung 30: Vitalitätsanalyse von hIL-6R positiven BaF3-Zellen nach Behandlung mit AIR-3A-ce6. ....	69
Abbildung 31: Zytotoxizität durch freies Chlorin e6. ....	71
Abbildung 32: Filterretentionsanalysen der 5-FU-modifizierten Aptamervarianten.....	73
Abbildung 33: Filterretentionsanalysen der 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten. ....	74
Abbildung 34: Analyse der 3'-Alexa647-markierten RNA AIR-3-FU. ....	76
Abbildung 35: Analyse der Bindung von 5-FU- und 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten an hIL-6R positiven BaF3-Zellen. ....	77
Abbildung 36: Stabilitätstest von AIR-3-FdU. ....	78
Abbildung 37: Stabilitätstest von AIR-3-FdU-2'FC und FdU-2'FC-Pool-RNA in Anwesenheit von FKS. ....	79
Abbildung 38: Analyse des spezifischen zytotoxischen Effekts von AIR-3-FdU auf hIL-6R positive BaF3-Zellen. ....	80
Abbildung 39: <i>Cross linking</i> (XL) von AIR-3 an das Zielprotein Hyper-IL-6. ....	82
Abbildung 40: Gelelektrophoretische Analyse der Spezifität des UV-XL von AIR-3 mit Hyper-IL-6.....	84
Abbildung 41: Gelelektrophoretische Analyse der Spezifität des UV-XL von AIR-3A mit Hyper-IL-6.....	84
Abbildung 42: Stabilität des UV-XL-Produktes von AIR-3A und Hyper-IL-6 unter verschiedenen Bedingungen.....	85
Abbildung 43 Prinzip der Positionsermittlung der XL-Bindung durch partielle Hydrolyse der RNA. ....	86
Abbildung 44: Analyse des UV-XL-Produktes von AIR-3A und Hyper-IL-6 vor und nach Behandlung mit RNase A. ....	87
Abbildung 45: Analyse der Fragmentierungen des UV-XL-Produktes mittels RNA-Sequenziergelen.....	88

Abbildung 46: Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide von reinem Hyper-IL-6 und dem UV-XL-Produkt von AIR-3A und Hyper-IL-6.....	91
Abbildung 47: Modell der durch AIR-3A vermittelten <i>in vitro</i> -PDT.....	100
Abbildung 48: Schema der zellulären Wirkung von AIR-3-5FdU.....	104
Abbildung 49: Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Bereichs von hIL-6R.....	108
Abbildung 50: Röntgenkristallstruktur des Thrombin bindenden Aptamers (TBA) mit Thrombin.....	109
Abbildung 51: Ausgewählte mögliche Bindestellen des hIL-6R für das Aptamer AIR-3A.....	109
Abbildung 52: Bioinformatische Simulation der G-Quadruplexstruktur von AIR-3A.....	112

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Drei- und Einbuchstabencode der kanonischen Aminosäuren. ....	XI
Tabelle 2: Aptamere in Klinischen Studien. ....	4
Tabelle 3: Aptamere für den gerichteten Wirkstofftransport. ....	11
Tabelle 4: Verwendete Antikörper. ....	31
Tabelle 5: Zusammensetzung eines <i>in vitro</i> -T7-Transkriptionsansatzes. ....	34
Tabelle 6: Zusammensetzung eines <i>in vitro</i> -T7-Transkriptionsansatzes unter Verwendung 2'- modifizierter Pyrimidin-Nukleosidtriphosphate. ....	35
Tabelle 7: Zusammensetzungen und Dimensionen der verwendeten denaturierenden PAA- Gele. ....	36
Tabelle 8: Reaktionsansatz zur 5'-terminalen Dephosphorylierung von RNAs. ....	37
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die 5'-terminale radioaktive Markierung. ....	38
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die 3'-terminale Glycolspaltung von RNA. ....	39
Tabelle 11: Reaktionsansatz der Hydrazonkopplung 3'-terminal oxidierter RNA. ....	39
Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels. ....	40
Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels. ....	40
Tabelle 14: Verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und deren apparative Einstellungen des kLSM. ....	50
Tabelle 15: Daten zur Quantifizierung zellgebundener Aptamere mittels Durchflusszytometrie. ....	52
Tabelle 16: Vergleich der hIL-6R-Moleküle auf der Zelloberfläche von durchflusszytometrisch analysierten Zelllinien. ....	59
Tabelle 17: Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) und relative Anteile gebundener RNA-Moleküle ( $B_{max}$ ). ....	60
Tabelle 18: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaxima von Chlorin e6 und AIR-3A-ce6. ....	61
Tabelle 19: Ergebnisse der aus den Filterretentionsanalysen berechneten Bindungsstärken der 5-FU-modifizierten Aptamervarianten. ....	73
Tabelle 20: Ergebnisse der aus den Filterretentionsanalysen berechneten Bindungsstärken der 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten. ....	74
Tabelle 21: Ergebnisse der Peptid-Identifikation (Fingerprint-Analyse) aus den massenspektrometrischen Analysen tryptischer Peptide von reinem Hyper-IL-6 und dem UV- XL-Produkt von AIR-3A und Hyper-IL-6. ....	90

## ABKÜRZUNGEN

<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>CTP</b>	Cytidin-5'-triphosphat
<b>2'-FCTP</b>	2'-Fluor-2'-desoxycytidin-5-triphosphat	<b>Da</b>	Dalton
<b>2'-F-Py</b>	2'-Fluor-2'-desoxypyrimidin-Nukleotid	<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>2'-OMe-Pu</b>	2'-Methoxy-2'-desoxypurin-Nukleotid	<b>dFdC</b>	2',2'-Difluor-2'-desoxycytidin (Gemzitabin)
<b>3'-invT</b>	3'-3'-verknüpftes Desoxythymidin	<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>5-FdUMP</b>	5-Fluor-2'-desoxyuridin- 5'-monophosphat	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>5-FdUTP</b>	5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat	<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinäure (desoxyribonucleic acid)
<b>5-FU</b>	5-Fluoruracil	<b>dNTP</b>	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<b>5-FUdR</b>	5-Fluor-2'-desoxyuridin	<b>DOX</b>	Doxorubicin
<b>5-FUR</b>	5-Fluoruridin	<b>dsRNA</b>	doppelsträngige RNA ( <i>double stranded RNA</i> )
<b>5-FUTP</b>	5-Fluoruridin-5'-triphosphat	<b>DsRNA</b>	Dicer-Substrat-siRNA
<b>A</b>	Adenin	<b>dTMP</b>	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
<b>a.u.</b>	<i>arbitrary units</i>	<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>abs</b>	Absorption	<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid
<b>AK</b>	Antikörper	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>AIPcS<sub>4</sub></b>	Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat	<b>EGFR</b>	Rezeptor des epidermalen Wachstums- faktors ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>AMD</b>	altersbedingte Makuladegeneration	<b>em</b>	Emission
<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie	<b>FACS</b>	Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase	<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>APC</b>	Allophycocyanin	<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward-scatter</i> )
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>G</b>	Guanin
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat	<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
<b>BaF3</b>	<i>bone marrow-derived pro-B-cell line</i>	<b>gp130</b>	Glykoprotein 130
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell-lymphoma-2</i>	<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat
<b>bp</b>	Basenpaar	<b>h</b>	Stunde
<b>BP</b>	Bandpass-Filter	<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )	<b>HFT</b>	Hauptfarbteiler
<b>C</b>	Cytosin		
<b>CBD</b>	Zytokin-bindende Domäne ( <i>cytokine binding domain</i> )		
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>		
<b>CDK</b>	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )		
<b>ce6</b>	Chlorin e6		
<b>CH<sub>2</sub>THF</b>	5-10-Methylentetrahydrofolat		

<b>H-IL-6</b>	Hyper-IL-6	<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>hIL-6R</b>	humaner Interleukin-6-Rezeptor	<b>PCI</b>	photochemische Internalisierung; kontextabhängig auch perkutane Koronarintervention
<b>IL-6</b>	Interleukin 6	<b>PDGF</b>	<i>platelet derived growth factor</i>
<b>IL-6R</b>	Interleukin-6-Rezeptor	<b>PDT</b>	Photodynamische Therapie
<b>Imd</b>	Imidazol	<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>JAK</b>	Janus-Kinase	<b>PEI</b>	Polyethylenimin
<b>kLSM</b>	konvokale Laser-Scanning-Mikroskopie	<b>PI</b>	Propidiumiodid
$\lambda$	Wellenlänge	<b>PLK-1</b>	Polo-Like-Kinase 1
<b>LNA</b>	<i>locked nucleic acid</i>	<b>PNK</b>	Polynukleotidkinase
<b>LP</b>	Langpassfilter	<b>PS</b>	Photosensibilisator
<b>LV</b>	Leucovorin, 5-Formyltetrahydrofolat	<b>PSMA</b>	Prostata-spezifisches Membranantigen
<b>M</b>	Molar	<b>PTK7</b>	Protein Tyrosin Kinase 7
<b>m/z</b>	Masse-Ladungsverhältnis	<b>Pu</b>	Purin-Nukleotid
<b>MALDI</b>	Matrix-unterstützte Laser-Desorption und Ionisation ( <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> )	<b>Py</b>	Pyrimidin-Nukleotid
<b>MAP</b>	Mitogen-aktiviertes Protein	<b>QD</b>	Quantenpunkt ( <i>quantum dot</i> )
<b>MAPK</b>	MAP-Kinase	<b>RANK</b>	Rezeptoraktivator von NF-kappa B
<b>MES</b>	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	<b>RISC</b>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>mIL-3</b>	murines Interleukin-3	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>min</b>	Minute	<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>miRNA</b>	microRNA	<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>MM</b>	Multiples Myelom	<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>	<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie; kontextabhängig auch: Multiple Sklerose	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>MTX</b>	Methotrexat	<b>s</b>	Sekunde
<b>NaOAc</b>	Natriumacetat	<b>SAP</b>	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
<b>NFT</b>	Nebenfarbteiler	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>NHS</b>	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimid	<b>SELEX</b>	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung ( <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> )
<b>nm</b>	Nanometer	<b>shRNA</b>	<i>small hairpin RNA</i>
<b>NMR</b>	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )	<b>sIL-6R</b>	löslicher Interleukin-6-Rezeptor ( <i>soluble interleukin-6 receptor</i> )
<b>NP</b>	Nanopartikel	<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>nt</b>	Nukleotide	<b>SOMAmer</b>	<i>Slow Off-rate Modified Aptamer</i>
<b>NTP</b>	Nukleosid-5'-triphosphat		
<b>OD</b>	optische Dichte		
<b>PAA</b>	Polyacrylamid		
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese		
<b>PAMAM</b>	Polyamidoamin		

<b>SSC</b>	Seitwärtsstreuung ( <i>side-scatter</i> )	<b>TOF</b>	Ionen-Flugzeitanalyse ( <i>time of flight</i> )
<b>ssDNA</b>	einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )	<b>TPPS<sub>2a</sub></b>	<i>meso</i> -Tetraphenylporphindisulfonat
<b>ssRNA</b>	einzelsträngige RNA ( <i>single stranded RNA</i> )	<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>	<b>U</b>	Uracil; kontextabhängig auch Unit
<b>T</b>	Thymin	<b>UTP</b>	Uridin-5'-triphosphat
<b>T<sub>4</sub>MPyP</b>	<i>meso</i> -Tetrakis(N-methyl-4-pyridiniumyl)porphyrin	<b>UV</b>	ultraviolett
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Pufferlösung	<b>v/v</b>	Volumenanteil ( <i>volume-volume percentage</i> )
<b>TdR</b>	2'-Desoxythymidin	<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin	<b>W</b>	Watt
<b>TMA</b>	Thrombotische Mikroangiopathie	<b>w/v</b>	Massenanteil ( <i>weight-volume percentage</i> )
		<b>XL</b>	cross linking

**Tabelle 1: Drei- und Einbuchstabencode der kanonischen Aminosäuren.**

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## ABSTRACT

Aptamers are oligonucleotides (DNA or RNA) with the ability to bind a certain target molecule due to their unique three-dimensional structure. Thus comparable, aptamers comprise significant advantages over antibodies such as convenient synthesis and feasibility in chemical derivatization as well as lower immunogenicity. Aptamers targeting a cell surface protein, e. g. a tumor marker, can be utilized to convey therapeutic cargo molecules into certain target cells.

In the presented thesis the 106 nt RNA-aptamer AIR-3 and its 19mer G quadruplex forming truncation AIR-3A were used for the delivery of therapeutic agents into cells bearing the human interleukin-6 receptor (hIL6R). The aptamers bound to hIL6R are internalized via endocytosis. Interleukin-6 and its receptor are involved in the formation and progression of several inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, as well as the development of cancer.

The photosensitizer chlorin e6 was chosen as one delivery cargo. Chlorin e6 generates reactive oxygen species upon longwave irradiation. It was conjugated to AIR-3A via an amid-linkage. Substantial uptake of the aptamer-chlorin e6 conjugate could be observed when hIL6R presenting cells were exposed to nanomolar amounts of it. Specific cell death could be induced to these cells by additional irradiation while hIL6R negative cells remained unharmed under the same conditions. To induce the same extend of non-cell specific cell death with the free chlorin e6 micromolar amounts were required.

Another therapeutic agent used for cell specific drug delivery is the chemotherapeutic nucleoside analog 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (5-FUdR). The aptamer AIR-3 was intrinsically modified with this drug by replacement of its uridine nucleosides with 5-FUdR. This modified aptamer variant was still able to bind the hIL-6R and could induce S-phase cytotoxicity to hIL-6R presenting cells exclusively. Cell cycle analysis of the affected cells was performed, implying that this effect was based on the release of 5-FUdR inside the cells by the degradation of the internalized aptamer.

Finally the interface of aptamer AIR-3A and hIL-6R was investigated by covalent linking of the two biomolecules using UV activated cross linking. The subsequent fragmentation of either the RNA-aptamer or its target protein revealed insights into the molecular connectivity of binding complex formed by them. These results may in future be used for a detailed binding model as well as for a better understanding of G quadruplex folding and protein binding in general.

## ZUSAMMENFASSUNG

Aptamere sind Oligonukleotide (DNA oder RNA), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung in der Lage sind, Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Sie sind daher mit Antikörpern vergleichbar, weisen jedoch entscheidende Vorteile gegenüber diesen auf, wie die einfachere Herstellung und chemische Modifizierbarkeit sowie ihre geringere Immunogenität. Aptamere, die ein Zelloberflächenprotein binden, z. B. einen Tumormarker, eignen sich für den aktiven Wirkstofftransport eines Therapeutikums durch das Ansteuern bestimmter Zielzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden das 106 nt RNA-Aptamer AIR-3 und seine minimale Verkürzung, das 19 nt G-Quadruplex-bildende AIR-3A, verwendet, um Therapeutika in Zielzellen einzuschleusen. Diese Aptamere binden an den humanen Interleukin-6-Rezeptor (hIL-6R) auf der Zelloberfläche und werden mit ihm durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Interleukin-6 und hIL-6R stehen im Zusammenhang mit der Entstehung und dem Fortschreiten verschiedener chronischer Entzündungen und Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose, als auch der Entstehung von Krebs.

Als ein möglicher Wirkstoff für den gerichteten Transport durch die genannten Aptamere wurde der Photosensibilisator Chlorin e6 ausgewählt. Chlorin e6 erzeugt unter Bestrahlung mit langwelligem sichtbarem Licht zytotoxische reaktive Sauerstoffspezies. Chlorin e6 wurde mit AIR-3A über eine Amid-Bindung verknüpft. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Aptamer-Chlorin e6 Konjugat in zweistelligen nanomolaren Konzentrationen effizient von hIL-6R-positiven BaF3-Zellen aufgenommen wurde. Zellspezifische Toxizität erfolgte durch anschließende LED-Bestrahlung ausschließlich in hIL-6R-positiven Zellen. Die Effizienz des Konjugates übertraf die des freien Chlorin e6 um ein bis zwei Größenordnungen unter identischen Versuchsbedingungen.

Ein weiterer verwendeter Wirkstoff war das chemotherapeutisch wirksame Nukleosid-Analogon 5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FUdR). Das Aptamer AIR-3 wurde intrinsisch mit diesem modifiziert, durch Austausch der Uridine gegen 5-FUdR. Diese modifizierte Aptamervariante wies eine um etwa eine Größenordnung geringere Affinität zu hIL-6R auf ( $K_d = 151 \pm 3$  nM) als das unmodifizierte Aptamer ( $K_d = 20,9 \pm 2,6$  nM) und hatte einen spezifischen Proliferationsrückgang um 25% für hIL-6R-positive BaF3-Zellen zur Folge. Zellzyklusanalysen der betroffenen Zellen zeigten, dass dies durch eine S-Phase-spezifische Zytotoxizität bedingt war, die durch externe Zufuhr von 2'-Desoxythymidin kompensiert werden konnte. Daher wurde auf 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (5-FdUMP) als aktiven Metabolit in den Zielzellen geschlossen, der intrazellulär durch Degradation des Aptamers und anschließende Phosphorylierung des dadurch freigesetzten 5-FUdR entsteht.

Außerdem wurden in dieser Arbeit Studien zur Charakterisierung der molekularen Interaktion von AIR-3A und hIL-6R durchgeführt. Hierfür wurden die an der Bindung beteiligten Reste der RNA und des Proteins durch UV-aktivierte Reaktionen kovalent miteinander verknüpft. Durch anschließende Fragmentierungen der RNA einerseits oder des Proteins andererseits konnten Hinweise auf die Lage an der Bindung beteiligter Aminosäurereste und Nucleobasen erhalten werden. Diese Ergebnisse können zukünftig zur detaillierten Beschreibung der Bindung als auch zur Beschreibung von G-Quadruplex-Faltungen allgemein genutzt werden.

## 1 THEORETISCHER TEIL

### 1.1 Aptamere

Seit ihrer ersten Erwähnung im Jahr 1990 [1, 2] haben sich Aptamere zu fortgeschrittenen Werkzeugen in der Molekularbiologie [3, 4], Nanotechnologie [5] und der medizinischen Forschung [6, 7] entwickelt. Bei Aptameren [*aptus*, „passend“ (lat.), *meros*, „Teil/Einheit“ (griech.)], handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung in der Lage sind, bestimmte Zielmoleküle zu binden. Sie zeichnen sich hierbei durch hohe Affinität als auch Spezifität gegenüber Zielmolekülen aus, wie Proteinen [8, 9], Peptiden [10], Metallionen [11], kleineren organischen Molekülen wie Fluoreszenzfarbstoffen [12] oder Aminosäuren [13], sowie auch ganzen Zellen [14, 15]. Ihre Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) liegen meist im pikomolaren bis niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich und sind damit vergleichbar denen von Antikörpern. Aptamere zeichnen sich allerdings durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die sie vorteilhaft gegenüber Antikörpern machen:

1) Höhere Stabilität. Während Proteine relativ leicht größtenteils irreversibler Denaturierung unterliegen können (z. B. unter erhöhten Temperaturen oder Salzkonzentrationen), können Oligonukleotide quasi beliebig oft de- und renaturiert werden und weisen deutlich höhere thermische Stabilität auf. Hierin liegt einer der entscheidenden Vorteile von Nukleinsäureaptameren, die deshalb sowohl in der Lagerung, als auch im Spektrum der möglichen experimentellen Anwendungen Antikörpern überlegen sind [16].

2) Herstellung und Modifikation. Die Identifizierung und Herstellung monoklonaler Antikörper ist im Vergleich zu Aptameren arbeits- und kostenintensiver. So hat der kommerzielle Erfolg von Antikörpern im klinischen Bereich zu einem erheblichen Bedarf an Antikörperproduktionen aus Säugerzellen im Großmaßstab geführt [17]. Zudem ist im Fall von Antikörpern die Vergleichbarkeit der Einzelchargen geringer als für Aptamere, so dass entsprechende Immuno-Assays zur Qualitätskontrolle erforderlich sind. Dagegen können Aptamere vergleichsweise kostengünstig und mit hoher Reproduzierbarkeit in Festphasensynthesen hergestellt werden. Diese Produktionsmethoden ermöglichen relativ leicht die Modifikationen an Aptameren in größerem Maßstab, z. B. zum Zwecke ihrer Stabilität oder Biokompatibilität [18].

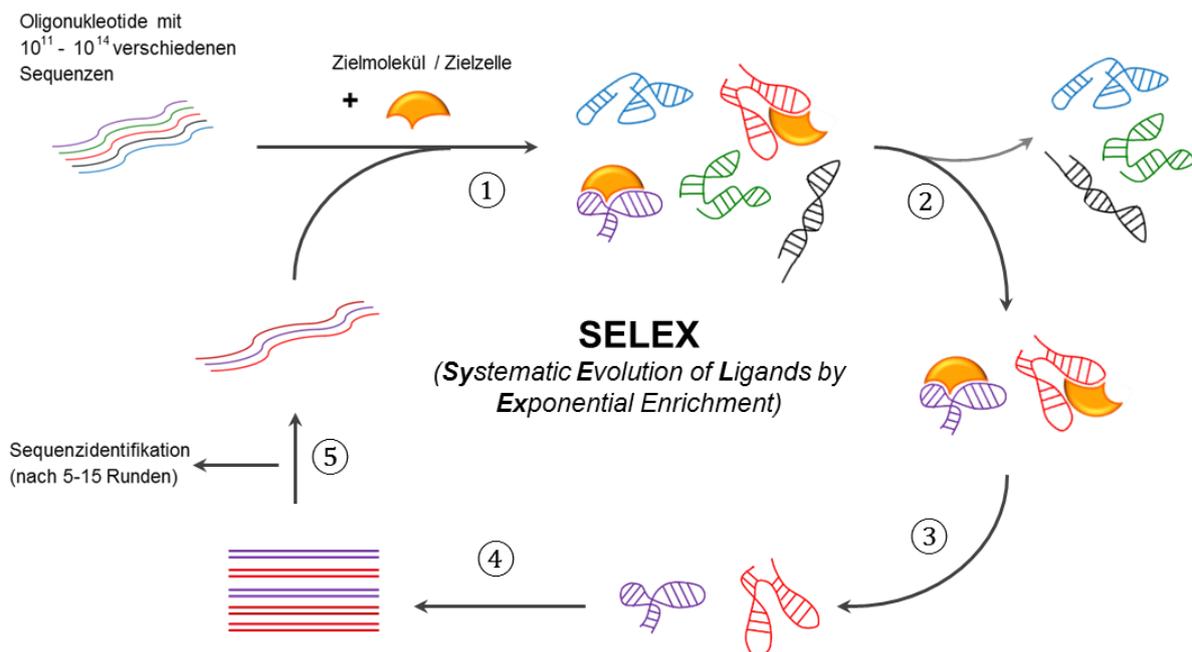
3) Geringe Immunogenität. Aptamere haben sich bisher als gering immunogen und wenig toxisch erwiesen. Dies wird im Allgemeinen der Tatsache zugeschrieben, dass es sich bei ihnen um eine natürlich vorkommende Substanzklasse (Nukleinsäuren) handelt. Dennoch kann es zur Aktivierung einer zellulären Immunantwort durch Aptamere kommen, wenn diese z. B. Strukturcharakteristika virale Nukleinsäuren aufweisen [19, 20]. Im Vergleich hierzu sind

Antikörper jedoch signifikant immunogen, wodurch Therapieansätze mit wiederholter Verabreichung nur sehr begrenzt möglich sind [21]. Die Eyetech Study Group konnte für Pegaptanib, dem einzig bisher zugelassenen Aptamertherapeutikum (siehe Abschnitt 1.1.2), zeigen, dass selbst 1000-fach höhere Dosierungen als therapeutisch angewandte zu keiner nachweisbaren Immunreaktion in Affen führt [22, 23].

4) Größeres Spektrum möglicher Zielmoleküle. Im Falle von toxischen Stoffen oder nicht-immunogenen bzw. nicht ausreichend immunogenen Stoffen (z. B. Haptene) ist es schwierig Antikörper zu generieren und zu produzieren. Für die Selektion von Aptamern sind hierdurch keine Beschränkungen gegeben, da diese zellfrei erfolgen kann (siehe folgender Abschnitt). Auch sind Aptamere bereits für sehr kleine Moleküle (z. B. Metallionen) generiert worden und können bezüglich dieser als Biosensoren angewendet werden [11, 18].

### 1.1.1 Aptamers Selektion

Üblicherweise werden Aptamere durch eine iterative Selektionsmethode gewonnen, welche als SELEX abgekürzt wird (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment; Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der SELEX-Prozess.** Die Generierung von Aptamern erfolgt durch iterative Selektion bindender Oligonukleotide aus einer anfänglichen Startbibliothek, die typischerweise  $10^{11}$  bis  $10^{14}$  verschiedene Sequenzen abdeckt. Die DNA- oder RNA-Oligonukleotide der Startbibliothek beinhalten terminal konstante Regionen (Primer-Bindungsstellen) welche einen randomisierten Bereich von 20-50 nt Länge flankieren. Nach Inkubation mit dem Zielmolekül (1) werden bindende Oligonukleotide von nicht-bindenden getrennt (2). Der anschließenden Elution der bindenden Oligonukleotide vom Zielmolekül (3) folgt deren Amplifikation durch PCR bzw. RT-PCR (4). Die anschließende Einzelstrangsynthese führt schließlich zu einer um die bindenden Oligonukleotide angereicherten Bibliothek (5). Diese wird den Schritten (1) bis (5) wiederholt unterzogen. Aus der finalen angereicherten Bibliothek werden Aptamere durch die Sequenz- und Bindungsanalyse einzelner Moleküle gewonnen.

Die überwiegende Mehrheit der in den vergangenen zweieinhalb Jahrzehnten publizierten Aptamere binden Proteine, Proteinuntereinheiten oder andere Biomoleküle. In der klassischen *in vitro*-SELEX werden die Zielmoleküle (z. B. rekombinante Proteine) meist an einer Matrix immobilisiert, z. B. an mit Sepharose beladenen Chromatographiesäulen [24] oder an magnetischen Mikropartikeln [25]. Eine Weiterentwicklung stellt die Cell-SELEX dar, in der ganze Zellen als *Target* eingesetzt werden [26]. Dieser Ansatz erfordert größere Expertise und birgt eine erhöhte Gefahr, unbeabsichtigt Aptamere für andere Targets zu erhalten. Um dieses Risiko gering zu halten, ist daher ein Gegenselektionsschritt mit geeigneten Kontrollzellen in den SELEX-Zyklen unerlässlich. Die Vorteile der Cell-SELEX bestehen unter anderem in der Möglichkeit durch eine geeignete Selektionsstrategie Aptamere für unbekannte Oberflächenmoleküle zu selektieren (*Blind-SELEX*), oder für solche, die in erhöhtem Ausmaß von den Zielzellen internalisiert werden (*Internalization-SELEX*) [27-29]. Die neuste Weiterentwicklung der SELEX-Methode besteht in der Selektion innerhalb eines Organismus (*in vivo-SELEX*) [30]. Mit dieser Methode konnten Cheng *et al.* in lebenden Mäusen Aptamere selektieren, die in signifikantem Maß die Blut-Hirn-Schranke überwinden konnten [31]. Der Erfolg neuerer SELEX-Methoden wird dabei maßgeblich vom Fortschritt der Sequenzierungstechnologien getragen (*next generation sequencing*). Dieser erlaubt es heute, den Verlauf der Sequenzverteilungen innerhalb der SELEX-Zyklen zu verfolgen und bereits geringfügig angereicherte Aptamersequenzen zu identifizieren [32, 33]. In den letzten Jahren wurde die SELEX-Methode zudem durch die Verwendung chemisch-modifizierter Nukleinsäuren erweitert [34]. Mit dem Einsatz von Nukleosidderivaten (z. B. 5-Aryl-modifizierte 2'-Desoxyuridine [35]) wurde die chemische Diversität und mit ihr das Spektrum an Interaktionen zu Zielmolekülen erhöht. Die entsprechenden Aptamere weisen dadurch meistens sehr geringe Dissoziationsraten ( $k_{\text{diss}}$  oder  $k_{\text{off}}$ ) auf (*SOMAmere*, *Slow Off-rate Modified Aptamers*) [36, 37]

### 1.1.2 Therapeutische Anwendung von Aptameren

Aptamere agieren in der therapeutischen Anwendung häufig als Kompetitoren natürlicher Bindungspartner, wodurch sie eine Alternative zu niedermolekularen Verbindungen und Antikörpern darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass Nukleinsäuren gemäß ihrer polyanionischen Natur Zellmembranen im Allgemeinen nicht passieren können, sind für die systemische Anwendung vor allem extrazelluläre Targets in den Fokus gerückt. Relevante Beispiele sind die frei im Blut vorkommenden Proteine der Blutgerinnung, wie Thrombin [38] oder der Von-Willebrand-Faktor [39], deren Aptamere als Antikoagulantien wirken. Für humanes  $\alpha$ -Thrombin, welches durch Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin aktivierend in der Blutgerinnungskaskade wirkt [40], sind seit 1992 bereits diverse Aptamere selektiert worden.

Von ihnen befindet sich das DNA-Aptamer NU172 aktuell in Phase II der klinischen Studien um als Arzneimittel zugelassen zu werden [41, 42]. Eine Reihe weiterer Aptamere durchläuft derzeit das Prüfungsverfahren der zuständigen Arzneimittelbehörden (siehe Tabelle 2). Macugen® von Pfizer ist bis heute das einzige zugelassene Aptamer-basierte Arzneimittel. Es wird zur Behandlung der altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) direkt in den Glaskörper des Auges injiziert. Sein von der Firma Eyetech entwickelter Wirkstoff Pegaptanib ist ein mehrfach modifiziertes 27 nt RNA-Aptamer. Dieses bindet den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und unterbindet so dessen Rezeptorbindung, sowie die von diesem getriggerte Angiogenese [43, 44].

**Tabelle 2: Aptamere in Klinischen Studien.**

Aptamer (Entwickler)	Zusammensetzung	Zielmolekül	Anwendungsgebiet	klinische Studien [45]	Lit.
<b>Pegaptanib/</b> Macugen (Pfizer/Eyetech)	RNA, 2'-OMe-Pu, 2'-F-Py, 3'- <i>invT</i> , 5'-PEG	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	altersbedingte Makula-Degeneration (AMD)	<b>zugelassen</b> (USA: 2005; EU: 2006)	[43, 44, 46]
<b>REG1</b> /RB006+RB007 (Regado Bioscience)	RB006: RNA, 2'-F-Py RB007(Pegnivacogen): RNA, 2'-OMe-Pu, 5'-PEG	Koagulationsfaktor IXa	perkutane Koronarintervention (PCI)	<b>Phase III</b> (Pegnivacogen: 2013-2015)	[47, 48]
<b>E10030/Fovista®</b> (Ophotech)	DNA, 2'-OMe-Pu, 5'-PEG, 3'- <i>invT</i>	<i>platelet derived growth factor</i> (PDGF)	altersbedingte Makula-Degeneration (AMD)	<b>Phase III</b> (2013-2016)	[49]
<b>NU172/ARC2172</b> (ARCA biopharma)	unmodifizierte DNA	$\alpha$ -Thrombin	koronare Bypass-OP	<b>Phase II</b> (2008-2011, 2013-?)	[42, 50]
<b>NOX-A12</b> (NOXXON Pharma)	L-RNA, 3'-PEG	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 12 (CXCL12, SDF-1 $\alpha$ )	Multipl. Myelom (MM), non-Hodgkin-Lymphom	<b>Phase II</b> (2011-2015)	[51]
<b>NOX-E36</b> (NOXXON Pharma)	L-RNA, 3'-PEG	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2 (CCL2, MCP-1)	Typ 2 Diabetes, diabetische Nephropathie	<b>Phase II</b> (2012-2013)	[52]
<b>ARC1779</b> (Archemix)	DNA, 2'-OMe-Pu/Py**, PS***, 3'- <i>invT</i> , 5'-PEG	A1-Domäne des Von-Willebrand-Faktors	thrombotische Mikroangiopathie (TMA)	<b>Phase II</b> (2008-2011),	[53, 54]
<b>AS1411/</b> AGRO001 (Antisoma)	dimerer DNA-G-Quadruplex	Nukleolin	akute myeloische Leukämie (AML)*, metastasierendes Nierenzellkarzinom (RCC)	<b>Phase II</b> (AML: 2008-2009, RCC: 2009-2010)	[55-57]
<b>ARC1905</b> (Ophotech)	RNA, 2'-OMe-Pu, 2'-F-Py, 3'- <i>invT</i> , 5'-PEG	Komplementfaktor 5	altersbedingte Makula-Degeneration (AMD)****	<b>Phase I</b> abgeschlossen (2012)	[58]

2'-OMe-Pu = 2'-Methoxy-modifizierte Purinnukleotide; 2'-F-Py = 2'-Fluor-modifizierte Pyrimidinnukleotide;

3'-*invT* = 3'-3'-Desoxythymidin-Kappe; 5'-PEG = Polyethylenglycol-Modifikation; PS = Phosphothioat-Modifikation;

\* in Kombination mit Cytarabin

\*\* 2/3 der Nukleotide 2'-OMe-modifiziert, 1/3 unmodifizierte 2'-Desonukleotide

\*\*\* nur eine Phosphothioatbindung im Aptamer-molekül

\*\*\*\* in Kombination mit einem VEGF-spezifischen Antikörper-Fragment

Zelloberflächenmoleküle stellen eine weitere Gruppe extrazellulärer *Targets* dar, für die Aptamere von medizinischem Nutzen sind. So lassen sich z. B. Aptamere, die ein Tumormarkerprotein auf Karzinomzellen binden, in Verbindung mit einem signalgebenden Molekül zu diagnostischen Zwecken nutzen [59, 60]. Damit steuert die Aptamertechnologie einen wichtigen Teil zur Entwicklung von Methoden der Früherkennung von Krebs und Metastasierungen bei. Erst kürzlich wurde ein Aptamer-basiertes Screening beschrieben, mit dem Tumorzellen bereits im ppm-Bereich nachgewiesen werden konnten (Nachweisgrenze  $\approx 4$  Tumorzellen) [61].

Für die Entwicklung klinischer Anwendungen von Aptameren gilt es verschiedene Gesichtspunkte der physiologischen Wirksamkeit zu beachten. Die Degradation von Nukleinsäuren durch Nukleasen stellt eine wesentliche Hürde dar. Aufgrund der Abundanz von RNAsen im menschlichen Serum gilt dies insbesondere für RNA-Aptamere. Eine Reihe chemischer Modifikationen kann nach oder bereits vor der Aptamerselektion angewandt werden, um die Anfälligkeit für nukleolytische Spaltungen zu verringern (siehe Aptamerbeispiele in Tabelle 2 und Tabelle 3). Der Austausch der 2'-Hydroxylgruppe in RNA gegen 2'-Fluor- (2'-F), 2'-Methoxy (2'-OMe) oder 2'-Methoxyethyl-Substituenten (2'-MOE) erhöht entscheidend die Widerstandsfähigkeit gegenüber Ribonukleasen [62]. Alternativ kann eine 2'-O-4'-C-Ethylenverbrückung eingeführt werden (LNA, *locked nucleic acid*). Diese Modifikation erhöht zudem die strukturelle Stabilität von doppelhelikalen Bereichen, da in den Ribose-Einheiten die hierfür notwendige 3'-*endo*-Konformation erzwungen wird [63]. Das Anfügen einer 3'-terminalen Kappe durch 3'-3'-verknüpftes Desoxythymidin (3'-*invT*) erhöht die Resistenz gegenüber dem Abbau durch Exonukleasen. Ebenso können die nicht-verbrückenden Sauerstoffatome des Phosphodiesterückgrads durch Schwefelatome ausgetauscht werden, wodurch erhöhte Nukleasebeständigkeit in Folge der Bindung von Serumproteinen erzielt wird. Der wahrscheinlich eleganteste Weg zur Beständigkeit gegenüber Nukleasen besteht in der Verwendung der Enantiomere der natürlich vorkommenden RNA (L-RNA oder Spiegelmer). Zur Verbesserung der Pharmakokinetik werden 5'-terminal üblicherweise Polyethylenglycol-Einheiten (PEG) oder Cholesterol angefügt. Dies führt zu einer verminderten renalen Resorption der kurzen Oligonukleotide und somit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Aptameren im Organismus [7].

### 1.1.3 Aptamere als Vehikel für den gerichteten Wirkstofftransport

Die zielgerichtete und selektive Freisetzung oder Anreicherung eines Therapeutikums am gewünschten Wirkort nach einer systemischen Verabreichung wird als gerichteter Wirkstofftransport bezeichnet (übersetzt aus dem Englischen *active drug targeting* oder *targeted drug delivery*). Dadurch wird sowohl die Effektivität des Wirkstoffes erhöht und als

auch systemische Nebenwirkungen verringert. Aptamere, die an Zelloberflächenmoleküle binden, können als Werkzeuge für den gerichteten Wirkstofftransport verwendet werden. Nach Bindung an ein membranständiges Molekül, wie z. B. einen Zellrezeptor, sind sie in der Lage, Internalisierungsvorgänge wie die rezeptorvermittelte Endozytose zu nutzen, um in das Zellinnere transportiert zu werden. Im vergangenen Jahrzehnt sind in zahlreichen Studien Beispiele des aptamervermittelten Wirkstofftransportes beschrieben worden (eine Auswahl an Beispielen ist am Ende dieses Kapitels in Tabelle 3 aufgeführt).

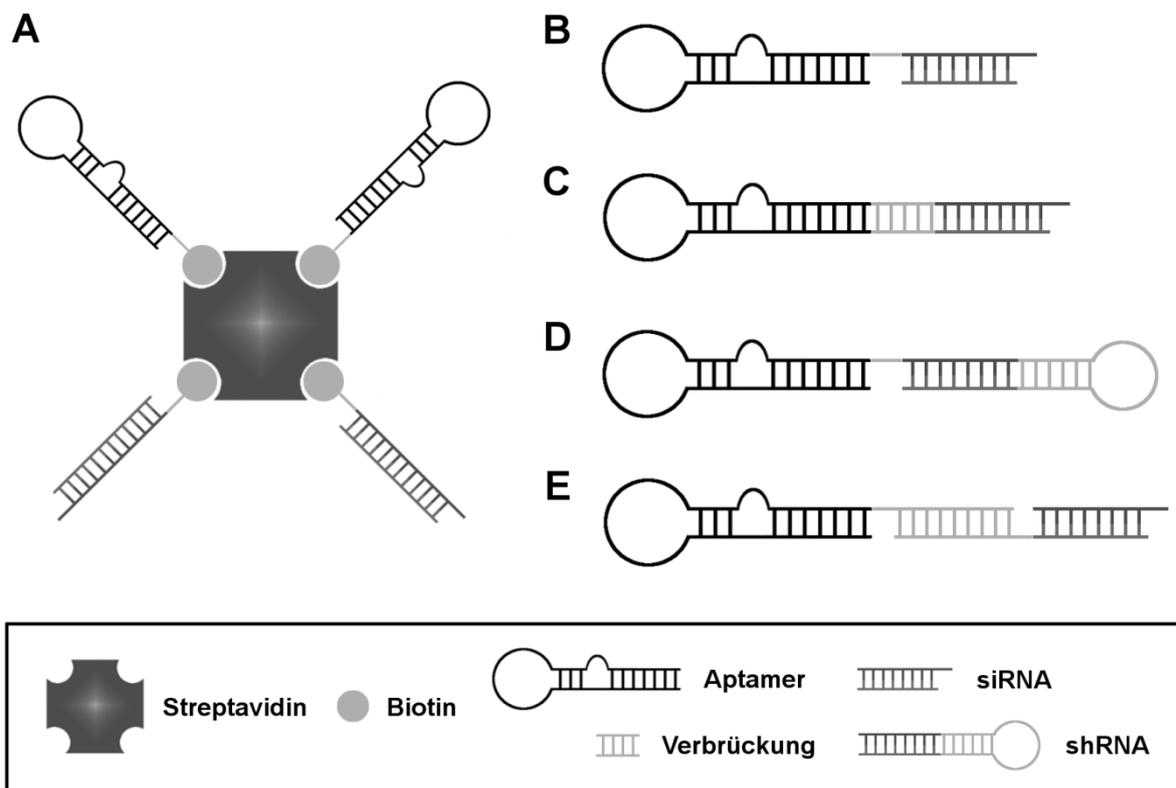
Wirkstoffe können kovalent oder nicht-kovalent mit Aptameren oder einem mit Aptameren funktionalisierten Trägerpartikel konjugiert werden. Die unterschiedlichen Kopplungsstrategien besitzen entsprechende Vor- und Nachteile. So liefern Reaktionen durch EDC/NHS- oder Maleimid-Chemie zwar effiziente Kopplungsausbeuten, bieten jedoch keine Möglichkeit, Wirkstoff und Aptamer in der Zielzelle wieder zu trennen. Dies kann erreicht werden, indem heterobifunktionale Linker verwendet werden, die eine interne Bindung mit z. B. säurelabilem Charakter besitzen. Die Wahl der Kopplungsstrategie richtet sich idealerweise nach der Sublokalisation des Aptamer-*Targets* in der Zelle.

Die Mehrheit der Oberflächenproteine wird über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Dieser Vorgang erfolgt für eine Reihe von Aptamer-*Targets* über das Ausbilden von Clathrin umhüllten Einbuchtungen, so z. B. im Fall des Prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) [64], des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) [65, 66] und des Transferrinrezeptors (TfR) [67]. Die intrazelluläre Route solcher Rezeptoren verläuft über das leicht saure frühe Endosom ( $\text{pH} \approx 6,0$ ), von wo aus nach dem Sortieren ein Teil direkt zur Zelloberfläche zurückgeleitet wird ( $t_{1/2} \approx 2,5$  min). Der übrige Anteil wird nach der Prozessierung zum späten Endosom ( $\text{pH} 5,0-6,0$ ) über Vesikeltransport dem Abbau im Lysosom ( $\text{pH} 5,0-5,5$ ) zugeführt [68]. Daher gelten Konjugationsstrategien mit säurelabilen Bindungen, wie Hydrazone, Schiff-Basen oder Acetale als geeignet, um den Wirkstoff innerhalb der Zelle vom Aptamer zu lösen. Anschließend erfolgt ein Transfer aus dem endozytotischen Vesikel ins Zytosol jedoch nur für Stoffe, die unter diesen Bedingungen membrangängig sind, wie z. B. Doxorubicin oder Chlorin e6. Für nicht-membrangängige Wirkstoffe, wie z. B. *small interfering RNAs* (siRNAs), werden daher weitere Adjuvantien eingesetzt, die das Verlassen des Endosoms ermöglichen (*endosomal escape agents*). Dies können Protonenschwämme [69], membranaktive Proteine [70] oder Peptide [71] sowie photoaktive Stoffe (*photochemical internalization*; PCI) [72] sein.

## 1.1.4 Strategien des aptamervermittelten Transports verschiedener Wirkstoffklassen

### 1.1.4.1 siRNAs und andere oligonukleotidbasierte Wirkstoffe

Für die therapeutische Nutzbarkeit von oligonukleotidbasierten Wirkstoffen wie siRNAs, microRNAs (miRNAs) und *antisense*-Oligonukleotiden, stellt das Einschleusen in Zielzellen eine entscheidende Schwierigkeit dar. Die aptamervermittelte Aufnahme bietet einen alternativen Ansatz zu viralen Vektoren oder der Verwendung von membran-interagierenden Hilfsstoffen (z. B. Liposomen oder Cholesterol) [73, 74]. Oligonukleotid-Therapeutika wiederum bilden eine bevorzugte Stoffklasse für den aptamervermittelten Transport, da sie, durch Verlängerung des Aptamers oder durch Hybridisierung an einen geeigneten Gegenstrang, verhältnismäßig einfach konjugierbar sind. Solche Konstrukte werden, aufgrund der Kombination zweier Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Funktionen, als Aptamer-siRNA-Chimären (AsiCs) bezeichnet.



**Abbildung 2: Auswahl publizierter Aptamer-siRNA/shRNA-Konjugate.** A) Nicht-kovalentes Streptavidin-Konjugat zweier biotinylierter anti-PSMA Aptamer-Moleküle und zweier biotinylierter 27nt DsiRNAs.[75]. B) und C) Chimären des verkürzten anti-PSMA Aptamers A10-3.2 [76]. Das Hybridisierungskonstrukt (B) stellt eine Optimierung der Chimären der ersten Generation [77] mit dem unverkürzten Aptamer A10 dar. Die Effektivität wurde erhöht, indem die siRNA-Stränge vertauscht und ein 3'-UU-Überhang hinzugefügt wurde. Das monomolekulare Stammschleife-Konstrukt (C) lieferte vergleichbare RNAi-Effekte. D) Aptamer-shRNA-Chimären sind für verschiedene Aptamere untersucht worden, darunter bivalente Konjugate mit Aptamer-Einheiten innerhalb der Stammschleife der mimikrierten miRNA [78]. E) Die sogenannten *stick*-siRNA-Konjugate sind aus drei Einzelsträngen durch überlappend hybridisierende Abschnitte aufgebaut. Erstmals beschrieben wurden diese Chimären von Zhou und Swiderski [79]. Spätere Weiterentwicklungen erfolgten durch Kohlenwasserstoff-Linker, zur Minimierung der sterischen Hinderung des Dicer-Enzyms [80].

Die ersten AsiCs-Studien wurden im Jahr 2006 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander veröffentlicht. In beiden Arbeiten wurden 2'-F-Py-RNA-Aptamere für PSMA verwendet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Ellington konstruierte nicht-kovalente Konjugate des biotinylierten Aptamers A9 und biotinylierter 27 nt Dicer-Substrat siRNAs (DsiRNAs) gegen Lamin A/C bzw. gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche über das Protein Streptavidin miteinander verbunden worden waren [75] (Abbildung 2A). Durch diese Konjugate konnte selektiv RNA-Interferenz (RNAi) in PSMA-positiven Zellen (LNCaP) ausgelöst werden. Eine andere Konjugationsstrategie wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Sullenger angewendet, um zwei in menschlichen Tumorzellen überexprimierte Gene herunterzuregulieren, die Polo-Like-Kinase 1 (*plk1*) und *bcl-2* [77]. Der *sense*-Strang der siRNA (*passenger*-Strang) wurde als Verlängerung des 3'-Terminus des Aptamers A10 co-transkribiert und der *antisense*-Strang (*guide*-Strang) an diesen hybridisiert (Abbildung 2B). Nach der Internalisierung dieser AsiCs wurde RNAi vermittelter Zelltod sowie reduziertes Wachstum und Rückbildung von Prostatakrebstumoren in Mäusen (Xenograft-Modell) beobachtet.

In den Folgejahren sind diverse weitere AsiCs-Studien verschiedener Aptamere mit siRNAs oder deren molekularen Vorläufern, den *small hairpin RNAs* (shRNAs; den endogenen miRNAs nachempfunden) veröffentlicht worden (siehe Abbildung 2 und Tabelle 3).

In der gleichen Weise lassen sich miRNAs Aptamer vermittelt in Zielzellen einschleusen. Die Zahl solcher Studien ist zwar deutlich geringer als für siRNAs, dennoch hat diese RNA-Klasse in den letzten Jahren verstärkt Aufmerksamkeit erhalten. Dies liegt maßgeblich an der wachsenden Zahl bekannter miRNAs und der Erkenntnis, dass miRNAs signifikante Anteile des menschlichen Genoms regulieren und in vielen Krebsformen dysregulierte miRNA-Expressionen vorliegen [81]. Mittlerweile wurden sowohl die Zulieferung anti-onkogener miRNAs [82] als auch das Einschleusen von *antisense*-Oligonukleotiden berichtet, die gegen eine onkogene miRNA gerichtet sind (Abbildung 4F) [83].

### 1.1.4.2 Anthracycline

Die Anthracycline Doxorubicin (DOX), Daunorubicin und Epirubicin wirken chemotherapeutisch durch Interkalieren in genomische DNA (bevorzugt zwischen Guanin und Cytosin) und die dadurch behinderte Replikation und Transkription. Eben diese Tendenz zum Einlagern in Nukleinsäuren kann ebenfalls genutzt werden, um sie nicht-kovalent mit internalisierenden Aptameren zu verbinden. Für DOX (Abbildung 3) sind zahlreiche Wirkstofftransporte verschiedener Aptamere bekannt (siehe Tabelle 3). Die zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Freisetzung kann über die Fluoreszenzeigenschaften der

Anthracycline verfolgt werden. Zudem sind diese Moleküle membranpermeabel, sodass ihre subzelluläre Lokalisation in den Kern erfolgen kann. Diese Eigenschaft kann jedoch dazu führen, dass diese Stoffe in nicht angesteuerte Zellen eindringen, wenn sie sich extrazellulär aus einem Aptamerkomplex lösen. Dieser Gefahr konnte in verschiedenen Studien durch säurelabile kovalente Konjugationen Abhilfe verschafft werden [84-87].

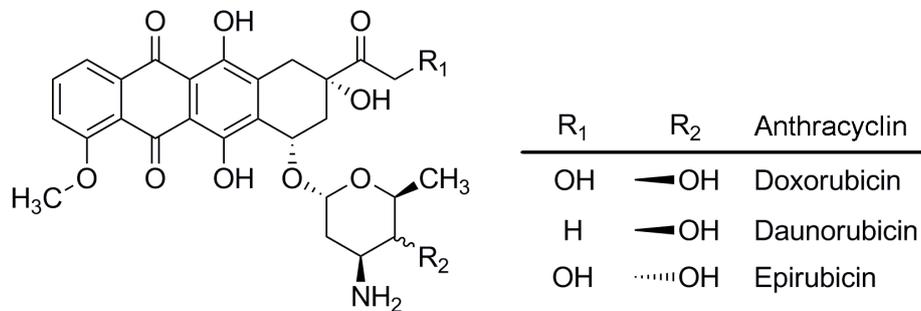


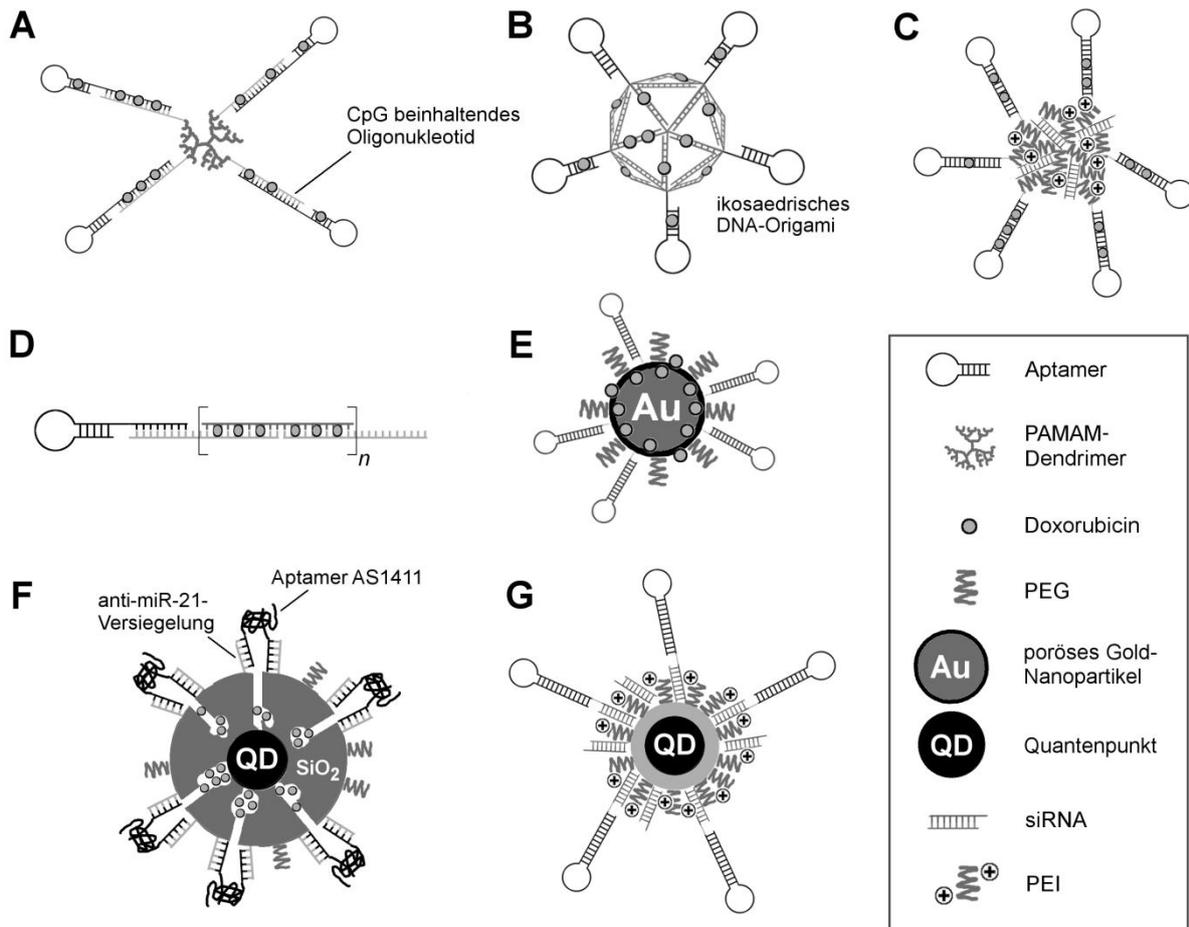
Abbildung 3: Strukturen von Doxorubicin und dessen Derivaten.

#### 1.1.4.3 Nanomaterialien

Nanoskopische Partikel basierend auf anorganischen Stoffen (Halbleiter-Quantenpunkte, Gold- oder Silicapartikel), (Bio-)Polymeren und deren physikalischen Aggregaten oder Nukleinsäure-Gerüsten (DNA-Origami, siehe Abbildung 4B und D) sind vielseitig als Transportladung einsetzbar. Dies liegt einerseits an den Materialeigenschaften (magnetische Resonanzeigenschaften, Fluoreszenz, Zytotoxizität), die zur Diagnostik oder Therapie genutzt werden können. Andererseits eignen sie sich als Trägerpartikel unterschiedlicher anderer Therapeutika. Bei derartigen Strategien wirken sich Multivalenzeffekte und größere Wirkstoffäquivalente positiv auf die Effizienz aus [88, 89]. Daher sind Nanopartikel (NP) im vergangenen Jahrzehnt in der Mehrheit der aptamervermittelten Wirkstofftransporte verwendet worden [90].

Die Kombination von zwei oder mehreren Therapeutika kann synergistische Effekte bewirken. Der Co-Transport von Doxorubicin ist sowohl durch die Kombination mit immunogenen CpG-reichen Oligonukleotiden [91] als auch mit shRNAs [92] über Nanokonstrukte realisiert worden (Abbildung 4A und C). Nanomaterialien können ebenfalls die für siRNAs notwendige intrazelluläre Freisetzung ins Zytosol gewährleisten. Polyaminierte Trägerstoffe haben sich hierfür in mehreren Studien als nützlich erwiesen (Abbildung 4C und G) [93]. In Abbildung 4 sind ausgewählte Beispiele von Aptamer-Wirkstoff-Konstrukten unter der Verwendung von Nanomaterialien dargestellt.

## THEORETISCHER TEIL



**Abbildung 4: Auswahl von Aptamer-Nanomaterial-Konjugaten.** A) Dendrimere Polyamidoamine (PAMAM) wurden für den chemoimmunotherapeutischen Co-Transport verwendet. CpG-beinhaltende Oligonukleotide wurden kovalent an die PAMAM-Dendrimere gekoppelt. Das PSMA-Aptamer A9 wurde an diese hybridisiert und Doxorubicin anschließend in die doppelsträngigen Bereiche interkaliert [91]. B) Darstellung eines DNA Icosaeders mit angebundenem MUC1-Aptamer, der sich als zellspezifischer Träger für Doxorubicin eignete [94]. C) Nanoträger für den Co-Transport von siRNAs und shRNAs sowie Doxorubicin. PSMA-Aptamere wurden kovalent verbunden mit verzweigtem Polyethylenimin-Polyethylenglycol (PEI-PEG) Co-Polymeren [92]. D) Das PTK7-Aptamer sgc8 tragende DNA-Nanostränge wurden aus repetitiv hybridisierenden Oligonukleotiden konstruiert. In diese Stränge konnte Doxorubicin für den krebszellspezifischen Wirkstofftransport eingelagert werden [95]. E) Schematische Darstellung von porösen Goldnanopartikeln ausgestattet mit einem CD30 RNA-Aptamer. Diese Partikel dienten als Träger für elektrostatisch an der Citrat-Beschichtung gebundenes Doxorubicin [96]. F) Quantenpunkte mit einer Hülle aus mesoporösem Siliciumdioxid wurden mit Doxorubicin beladen. Die Poren wurden durch hybridisierende DNA-Stränge verschlossen, die einerseits die Sequenz des Nukleolin-Aptamers AS1411 und andererseits die reverskomplementäre Sequenz der onkogenen miRNA miR-21 beinhalten. Dadurch erfolgte selektive Freisetzung des Wirkstoffes in Zellen mit erhöhter Expression von miR-21 [83]. G) Rational konstruierte Nanoträger. Polymerbeschichtete Quantenpunkte wurden nicht-kovalent mit kationischem Polyethylenimin (PEI) umhüllt und mit thiol-modifizierten siRNAs durch elektrostatische Wechselwirkungen beladen. Ein PSMA-Aptamer wurde abschließend über Disulfidbrücken mit den siRNAs verbunden [93].

Neben diesen Wirkstoffklassen sind weitere Effektormoleküle (z. B. Radionuklide und Proteine) erfolgreich durch Aptamere in Zellen eingeschleust worden. Diese können Tabelle 3 auf der folgenden Seite entnommen werden. Photosensibilisatoren werden ausführlicher in Abschnitt 1.3 und therapeutisch wirksame Nucleosid-Analoga in Abschnitt 1.4 diskutiert.

**Tabelle 3: Aptamere für den gerichteten Wirkstofftransport**

Zielmolekül	Aptamer	Art	Beförderte Wirkstoffe	Literatur
<b>Prostata-spezifisches Membran-antigen (PSMA)</b>	A10, A10-3.2, A9 und A9L	RNA, 2'-F-Py	Verschiedene Nanopartikel, beladen mit Chemotherapeutika	[97-104]
			Interkaliertes Doxorubicin	[105, 106]
			PI3K-inhibitor TGX-221 eingebettet in PEG-PCL-Mizellen	[107]
			Co-Transport von Doxorubicin und shRNAs gegen Bcl-xL in Nanopartikeln	[92]
			siRNA- oder shRNA-Chimären gegen verschiedene Onkogene	[76-78, 108, 109]
			miRNAs verpackt in PAMAM Dendrimern	[110]
			DsiRNA-Streptavidin-Konjugate	[75]
			Co-Transport von Doxorubicin und dem Immunstimulans CpG	[91]
	STZT101	DNA	Koalent fixiertes Doxorubicin-Interkalat in einem Aptamer-Dimer	[84]
<b>Protein-Tyrosin-Kinase-7 (PTK7)</b>	sgc8 und sgc8c	DNA	Interkalate mit Doxorubicin und Daunorubicin	[95, 112]
			Au- und Au-Ag-Nanostäbchen (Photothermale Therapie), kombiniert mit ce6	[88, 113, 114]
			Virales Kapsid	[115]
			Nanopartikel, beladen mit Doxorubicin	[116, 117]
			DNA-Origami-Nanoroboter mit immunstimulierenden Wirkstoffen	[118]
<b>EGFR*</b>	E07	RNA, 2'-F-Py	Chemotherapeutisches Nucleosid-Analogon Gemcitabin (dFdC)	[119]
			Au-Nanopartikel	[120]
<b>Nukleolin</b>	AS1411	DNA	Verschiedene Nanopartikel zum Transport von Chemotherapeutika	[83, 86, 121-124]
			Physikalisches Konjugat mit dem Photosensibilisator TMPyP4	[125]
			Cobaltferrit-Nanopartikel mit <sup>67</sup> Ga für die duale Tomographie	[126]
			Liposomen, beladen mit anti-BRAF siRNAs	[127]
			Chelatisiertes Radionuklid <sup>64</sup> Cu	[128]
<b>Transferrin-Rezeptor</b>	c2, FB4 und GS24	RNA, 2'-F-Py; DNA	Liposomen, beladen mit verschiedenen siRNAs	[130]
			Streptavidin-Konjugate des lysosomalen Enzyms $\alpha$ -L-Iduronidase	[131]
			Quantenpunkt-Konjugate	[132]
<b>Mucin-1 (MUC1)</b>	MUC1-5TR1**, MUC1-S1.3/S2.2, MA3	DNA	Doxorubicin-Interkalate	[94, 133]
			Photosensibilisator Chlorin e6	[134]
			Komplementfaktor-Komponente C1q	[135, 136]
			Chelatisiertes Radionuklid <sup>99m</sup> Tc	[137]
			Mit Paclitaxel beladene Nanopartikel	[138]
<b>HIV-1 gp120</b>	A-1	RNA, 2'-F-Py	miRNA-Chimären	[139-141]
			anti- <i>tat/rev</i> siRNA-Chimären	[79, 142, 143]
<b>Tenascin-C</b>	TTA1	RNA†	Chelatisiertes Radionuklid <sup>99m</sup> Tc	[144]
<b>RANK***</b>	Apt1	RNA‡	Poröse Au-Nanopartikel beladen mit Doxorubicin	[96]
			siRNAs verpackt in PEI-Nanopartikeln	[145]
<b><math>\alpha</math>v<math>\beta</math>-Integrin</b>	Apt- $\alpha$ v $\beta$ 3	RNA, 2'-F-Py; DNA‡‡	Chimären mit anti-EEF2 siRNAs	[146]
			Magnetische Nanopartikel für die Magnetresonanztomographie	[35]

\* EGFR = Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor      \*\* weitere Aptamere sind Quelle [134] zu entnehmen

\*\*\* RANK = Rezeptoraktivator von NF-kappa B; Dieses Aptamer bindet ebenso den Tumormarker CD30.

† Das Tenascin C-Aptamer TTA1 trägt diverse Modifikationen: 2'-F-Py, teilweise 2'-OMe-Pu, 3'-invT, sowie eine interne Hexa(ethylenglycol)-Brücke.

‡ Das CD30-Aptamer Apt1 trägt die Modifikationen 2'-F-Py und 2'-OMe-Pu.

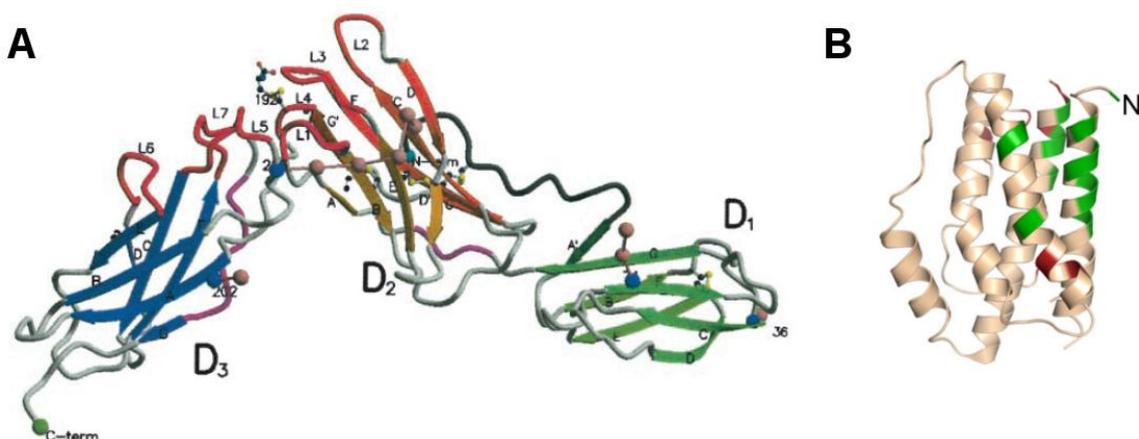
‡‡ Das DNA-Aptamer Apt- $\alpha$ v $\beta$ 3 beinhaltet [5-*N*-(Benzylcarboxyamid)-2'-desoxyuridine] anstelle von Desoxythymidin.

## 1.2 Interleukin 6 und der Interleukin-6-Rezeptor

Zytokine sind von Zellen sekretierte lösliche Glykoproteine, die durch Rezeptorbindungen die Proliferation und Differenzierung benachbarter Zellen (parakrin), weit entfernter Zellen (endokrin) oder der abgebenden Zelle selbst (autokrin) regulieren. Diese Botenstoffe werden von einem breiten Spektrum an Zellen produziert, wie Zellen des Immunsystems (Makrophagen, B- und T-Zellen oder Mastzellen), Endothelzellen und Fibroblasten. Interleukine stellen eine Klasse der Zytokine dar, die Immun- und Entzündungsreaktionen vermitteln.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin und kann sowohl inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch wirken. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, sowie von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen produziert. Seine Hauptfunktion besteht in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen durch endokrine Wirkung auf Hepatozyten, die dadurch zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen angeregt werden. Daneben bewirkt es autokrin und parakrin das Wachstum und die Differenzierung von B- und T-Zellen [147, 148].

Der reife IL-6-Rezeptor (IL-6R, auch gp80 oder CD126) besteht aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (82 Aminosäuren; AS), einer Transmembranregion (28 AS) und einem extrazellulären Teil (339 AS). Er besitzt in der vollständig glykosylierten Form ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Der extrazelluläre Teil setzt sich aus drei Domänen zusammen (Abbildung 5A). Die N-terminale Domäne D1 besitzt eine immunglobulin-ähnliche Faltung vom C1-Typ [149] und wurde als relevant für die Stabilität und den extrazellulären Transport des Proteins nachgewiesen [150].



**Abbildung 5: Kristallstrukturen von hIL-6R und hIL-6.** A) Struktur der extrazellulären Region von hIL-6R [151]. Von den  $\beta$ -Schleifen L1 bis L7 (rot) in den Domänen D2 und D3 erfolgen Bindungen zu IL-6 und gp130. B) Struktur von hIL-6 [152]. Farblich hervorgehoben sind die Kontaktstellen zu hIL-6R und gp130 (rot) und der Teil dieser Kontaktflächen, die durch das Aptamer SL1025 (siehe Abschnitt 1.1.2) blockiert werden (grün).

Die IL-6 bindenden Domänen D2 und D3 entsprechen jeweils dem Fibronectin-Typ-III und sind homolog zu zytokinbindenden Domänen (CBD) anderer Rezeptoren [153]. Bei seinem natürlichen Liganden IL-6 handelt es sich strukturell um ein Protein der 4-Helix-Bündel-Familie bestehend aus 184 AS (Abbildung 5B).

Die Signalvermittlung durch IL-6 setzt neben IL-6R ( $\alpha$ -Kette) das Vorhandensein von Glykoprotein 130 (gp130,  $\beta$ -Kette) auf der Zelloberfläche voraus. Im Gegensatz zu IL-6R wird gp130 ubiquitär von Zellen präsentiert und dient auch als Co-Rezeptor für andere Zytokine [154]. Durch Bildung eines Komplexes von IL-6 und IL-6R mit gp130 (als Tetramer: IL-6/IL-6R/gp130<sub>2</sub> oder als Hexamer: IL-6<sub>2</sub>/IL-6R<sub>2</sub>/gp130<sub>2</sub> [151]), wird die Signaltransduktion in der Zelle aktiviert. Diese verläuft, vermittelt durch den cytoplasmatischen Teil von gp130 über die JAK/STAT- oder den MAPK-Signalweg [155]. Neben dieser klassischen Signallaktivierung mit membranständigem IL-6R (*cis signaling*) können auch Zellen durch IL-6 stimuliert werden, die den IL-6R nicht präsentieren. Dies erfolgt über sogenanntes *trans signaling*. Dabei interagiert gp130 auf der Zelloberfläche mit einer löslichen Form des IL-6R (sIL-6R), welche durch proteolytische Spaltung (*shedding*) oder alternatives Spleißen entstehen kann [156].

In der Arbeitsgruppe von Prof. Rose-John wurde im Jahr 1997 das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 (H-IL-6) entwickelt. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein von sIL-6R, dessen C-Terminus über einen flexiblen Peptidlinker (29 AS) mit dem Zytokin IL-6 verbunden ist ( $m \approx 68$  kDa, 510 AS). Hyper-IL-6 ist in der Lage, in gp130 präsentierenden Zellen die IL-6-abhängige Signaltransduktion zu vermitteln. Hierfür sind gegenüber einer Kombination aus sIL-6R und IL-6 100 bis 1000-fach niedrigere Konzentrationen notwendig [157].

### 1.2.1 Interleukin-6 und Interleukin-6-Rezeptor als therapeutische Ziele

Interleukin-6 und der IL-6-Rezeptor stehen im Zusammenhang mit der Entstehung und dem Fortschreiten vieler Krankheitsbilder. Hierzu zählen hauptsächlich chronische Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten, z. B. der Gelenke (Rheumatische Arthritis [RA] und Osteoarthritis), des Darms (Morbus Crohn) oder des zentralen Nervensystems (Multiple Sklerose [MS]). Ebenso wird IL-6 onkogenetisches Potential zugeschrieben, einerseits als Folge chronischer Entzündungen (z.B. Multiple Myelome oder Leberkarzinome) [158], andererseits durch Aktivierung anti-apoptotischer Gene wie *bcl-2* [148]. In vielen Formen der genannten Krankheiten sind die Entzündungsreaktionen durch erhöhte Konzentrationen von IL-6 oder sIL-6R bedingt. Daher besteht ein Therapieansatz in der Blockierung der Interaktion dieser Proteine untereinander, bzw. ihrer Interaktion mit den membranständigen Proteinen IL-6R und gp130 [148].

Als IL-6/IL-6R-blockierende Therapeutika haben sich bisher Antikörper bewährt. So wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Kishimoto der IL-6R- und sIL-6R-bindende und blockierende Antikörper Tocilizumab entwickelt. Tocilizumab ist seit 2008 als Therapeutikum zugelassen und wird seitdem zur Behandlung von RA und anderer Entzündungskrankheiten eingesetzt [159]. Ein weiteres Beispiel ist der erst kürzlich zugelassene IL-6 bindende und inhibierende Antikörper Siltuximab, der bei Patienten mit Morbus Castleman eingesetzt wird [160]. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Form anormalen Wachstums der Lymphknoten, die häufig mit der Bildung gutartiger Tumore einhergeht und durch erhöhte IL-6-Konzentrationen im Blut gekennzeichnet ist.

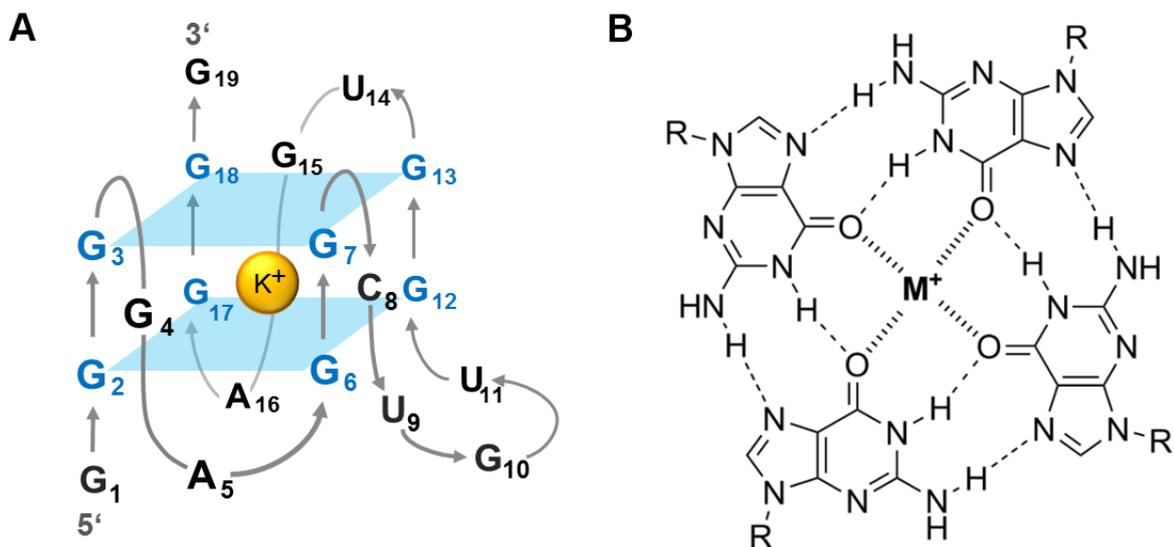
Erhöhte Expression des membranständigen IL-6R oder eine anormal erhöhte Zahl IL-6R präsentierender Plasmazellen stehen ebenfalls im Zusammenhang mit einigen Krankheitsbilder [161]. So wurden erhöhte Werte der Expression und Signaltransduktion von hIL-6R in den pathogenen CD4-postiven Effektor-T-Zellen von Patienten mit schubförmig remittierender MS (RR-MS) gefunden. Die dadurch resultierende Störung der Selbsttoleranz des Immunsystems (die pathogenen Zellen sind resistent gegenüber den regulativen T-Zellen) konnte durch Blockieren von IL-6R unterbunden werden [162].

Mit dem SOMameren SL1025 und SL1032 wurden 2014 die ersten Aptamere zur Blockierung der IL-6/IL-6R-Interaktion publiziert. Beide DNA-Aptamere binden spezifisch an humanes IL-6 ( $K_d = 0,2 \text{ nM}$ ) und blockieren effektiv dessen Bindung an sIL-6R sowie an IL-6R auf verschiedenen Zelllinien. Die relative Inhibition der IL-6 vermittelten Zellproliferation übertraf sogar die von Tocilizumab. Sowohl SL1025 als auch SL1032 wurden durch diverse chemische Modifikationen (z.B. Aryl-modifizierte Nukleobasen) optimiert, die zu einer sehr geringen Dissoziationskinetik ( $t_{1/2} = 6,9 \text{ h}$  bzw.  $28 \text{ h}$ ) und hohen Serumsstabilität führten (nahezu keine Degradation über 48 h in einer Lösung mit 90% humanem Serum). Daher erfüllen diese Aptamere bereits wichtige Voraussetzungen für die therapeutische Anwendung [163].

Zwei weitere Aptamere sind beschrieben worden, die indirekt die Wirkung von IL-6 eindämmen. IL-17 sezernierende T-Helferzellen (Th17-Zellen) aktivieren parakrin die Produktion IL-6 [164]. Die DNA-Aptamere Apt21-2 [165] und RA10-6 [166] eignen sich zur Behandlung von Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis, da sie durch Binden an IL-17A bzw. IL-17RA in der Lage sind, die Wechselwirkungen von IL-17A zu IL-17RA zu blockieren und damit die von den Th17-Zellen hervorgerufene IL-6-Produktion zu senken.

### 1.2.2 Interleukin-6-Rezeptor spezifische RNA-Aptamere AIR-3 und AIR-3A

In der Arbeit von Dr. Cindy Meyer wurde das 106 nt RNA-Aptamer AIR-3 selektiert, das spezifisch an den Interleukin-6 Rezeptor mit einem  $K_d$  von 20 nM bindet [167]. AIR-3A stellt die minimale Verkürzung von AIR-3 dar, die nur die Sequenz des 19 nt-langen minimalen Bindemotivs von AIR-3 beinhaltet (5'-GGGGAGGCUGUGGGUGAGGG-3'), welches einen G-Quadruplex bildet (Abbildung 6A) [168, 169]. G-Quadruplexe sind Struktur motive in DNA oder RNA, die in G-reichen Nukleinsäuren vorkommen können. Dabei handelt es sich um Stapelkomplexe von sogenannten G-Tetraden, die wiederum aus vier über *Hoogsteen*-Basenpaarungen verbrückte Guanin-Einheiten bestehen (Abbildung 6B). Zur Kompensation der elektrostatischen Abstoßung durch die Sauerstoffatome der Guanine, werden von diesen bevorzugt einwertige Kationen wie  $K^+$  oder  $Na^+$  zwischen den Tetraden komplexiert. DNA-G-Quadruplexe wurden in verschiedenen Promotor- und Telomerregionen gefunden und dienen, meist durch Proteinbindung, der Transkriptions- und Replikationskontrolle, sowie der Stabilisierung des Genoms [170]. Natürlich vorkommende RNA-G-Quadruplexe wurden zum einen in Transkripten telomerer-Sequenzen (*telomeric repeat containing RNAs*; TERRA) gefunden, die zur Regulation der Telomerverlängerung beitragen [171]. Zum anderen wurden diese Struktur motive auch im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) der mRNAs mehrerer Gene nachgewiesen und für zahlreiche weitere Gene vorhergesagt. Als Funktion dieser Quadruplexe wird u. a. die Regulation der Translationsinitiation angenommen, analog der bekannten Regulation durch Stammschleifenstrukturen im 5'-UTR [172].



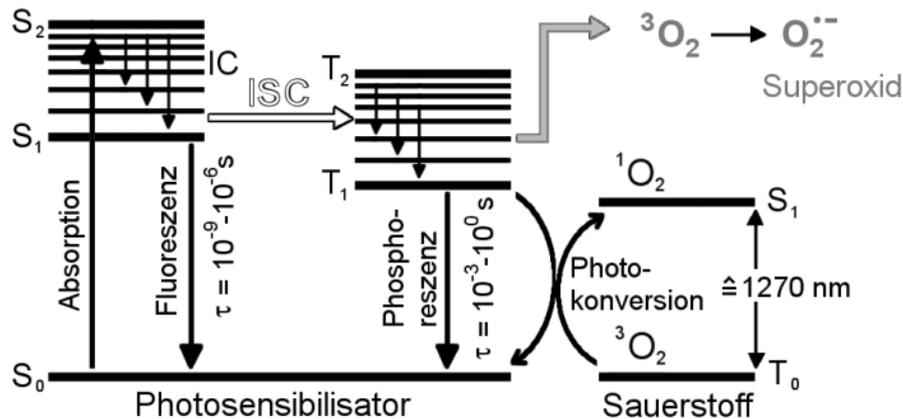
**Abbildung 6: Strukturmodell des Aptamers AIR-3A.** A) Schematische Darstellung des für AIR-3A angenommenen all-parallelen G-Quadruplexes mit zwei G-Tetraden und einem komplexierten Kaliumion. B) Allgemeine Anordnung innerhalb einer G-Tetrade. Wechselwirkungen innerhalb einer G-Tetrade erfolgen durch *Hoogsteen*-Basenpaarungen (Wasserstoffbrückenbindungen). Dative Bindungen erfolgen zum komplexierten Metallion ( $M^+$ ) welches sich zwischen den Tetradenebenen befindet.  $M^+ = K^+, Na^+, Li^+$ . R = Ribose oder Desoxyribose.

Die Dissoziationskonstante von AIR-3A wurde für die Bindung an das rekombinante Protein Hyper-IL-6 mit  $K_d = 60$  nM und für IL-6R präsentierende Zellen mit  $K_d = 8,5$  nM ermittelt [168]. Durch AIR-3A wird weder die Bindung von IL-6R an IL-6 noch an gp130 beeinflusst. Ebenso konnte keine Beeinträchtigung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion festgestellt werden. Für die murine prä B-Zelllinie BaF3 konnte nachgewiesen werden, dass AIR-3A nach Bindung an IL-6R auf der Zelloberfläche in die Zelle endozytiert wird [169]. Dieser Vorgang ließ sich bereits nutzen um fluoreszenzmarkierte Konjugate des Proteins Streptavidin in diese Zellen zu befördern. Ein biologischer Effekt in den betroffenen Zellen konnte hingegen noch nicht beobachtet werden.

### 1.3 Photodynamische Therapie

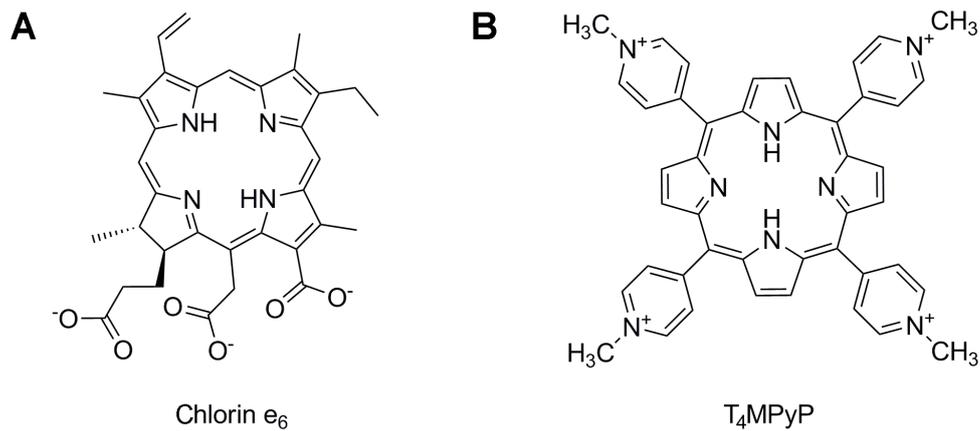
Die photodynamische Therapie (PDT) wird klinisch zur nichtoperativen Behandlung von Hautkrankheiten, wie aktinischer Keratose, oder zur Behandlung von chirurgisch freigelegten Tumoren angewendet. Ihr Wirkungsprinzip beruht auf der Kombination von photoreaktiven Stoffen (Photosensibilisatoren) und elektromagnetischer Strahlung (typischerweise 600-800 nm) für deren Anregung. Photosensibilisatoren akkumulieren mehr oder weniger spezifisch in malignen Zellen. Bei diesen Stoffen handelt es sich chemisch in der Regel um Tetrapyrrol-Verbindungen wie Phthalocyanine und Porphyrine, deren reduzierte Derivate, wie Chlorine (z. B. Tomoporphin, Foscan®), oder biologische Vorstufen von Porphyrinen, wie z. B. 5-Aminolävulinsäure (Gliolan®) [173-175].

Photosensibilisatoren können durch die aktivierende Strahlung aus dem Grundzustand in einen höheren Singulettzustand angeregt werden. Durch *inter system crossing* (ISC) kann der Übergang in einen Tripletzustand erfolgen. Die Moleküle dieser Art können bei der Rückkehr Energie auf ein geeignetes Akzeptormolekül übertragen. Ein solches stellt molekularer Sauerstoff dar, welcher bei diesem Vorgang aufgrund der Gesamtspinerhaltung vom Triplet- ( $^3\text{O}_2$ ) in den Singulettzustand ( $^1\text{O}_2$ ) übergeht (Abbildung 7). Singulett-Sauerstoff ist eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die oxidativen Schaden in Zellen ausübt. Dieser führt in Abhängigkeit seiner Quantität und der betroffenen Zellbestandteile zu apoptotischem oder nekrotischem Zellsterben. Neben der Erzeugung von ROS durch Photonenübertragung (Typ II-Reaktion) kann deren Entstehung auch durch die Aufnahme eines Elektrons oder eines Wasserstoffatoms von einem benachbarten Molekül des Photosensibilisators initiiert werden (Typ I-Reaktion).



**Abbildung 7: Jablonski-Diagramm der elektronischen Übergänge von Photosensibilisatoren.** Durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung wird ein Elektron des Photosensibilisators aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten elektronischen Zustand ( $S_1$ ) unterschiedlicher angeregter Schwingungszustände angehoben. Nach dem Energieverlust durch interne Konversion (IC) befindet sich das Elektron im Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  für ca.  $10^{-9} - 10^{-6} \text{ s}$ . Es kann von dort durch Lichtemission in  $S_0$  zurückkehren (Fluoreszenz) oder durch *inter system crossing* (ISC) in einen schwingungsangeregten Tripletzustand ( $T_1$ ) übergehen. Die Lebensdauer von  $T_1$  (ca.  $10^{-3} - 1 \text{ s}$ ) ist entscheidend für die Effizienz des Photosensibilisators, da über diesen die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verläuft. Moleküle, die nicht durch Phosphoreszenz in  $S_0$  zurückkehren, können ROS durch zwei Reaktionstypen erzeugen: 1) Durch Radikalreaktionen (in grau, Typ I-Reaktion) oder 2) durch Photonenübertragung (Photokonversion, Typ II-Reaktion). Die Photokonversion von Triplett-Sauerstoff ( ${}^3\text{O}_2$ ) zu Singulett-Sauerstoff ist für Porphyrine durch ähnliche Energieabstände der elektronischen Zustände begünstigt.

Die aufgenommene Menge des Photosensibilisators und dessen Lokalisation in der Zelle sind von entscheidender Bedeutung für die Folgen der Zellschädigung, da die mittlere Reichweite von Singulett-Sauerstoff unter physiologischen Bedingungen auf wenige Nanometer beschränkt ist [176]. Gut zugängliche äußere Zellbereiche, wie die Zellmembran, sind ein verstärktes Ziel der ROS, insbesondere bei kurzer Inkubation mit amphiphilen und anionischen Photosensibilisatoren, wie Chlorin e6 (Abbildung 8A) [177]. Die Schädigung der Lipide und Proteine der Zellmembran sind jedoch weniger effizient zur Einleitung eines geregelten Zelltods, als Schädigungen der DNA des Zellkerns. Nukleinsäuren hingegen, wie die genomische DNA, können tendenziell schlechter gezielt angesteuert werden, da dies die entsprechende Sublokalisierung des Photosensibilisators voraussetzt. Längere Inkubationszeiten mit kationischen Photosensibilisatoren haben sich hierfür als am ehesten geeignet gezeigt, wie *meso*-Tetrakis(N-methyl-4-pyridiniumyl)porphyrin ( $T_4\text{MPyP}$ , Abbildung 8B) [178, 179]. Ein wesentlicher Nachteil der PDT ist ihre geringe Zellspezifität. Dadurch kommt es, obwohl die Wirkung über die Bestrahlung lokal begrenzt werden kann, zur Schädigung des zellumgebenden Gewebes und häufig zu lokalen Entzündungsreaktionen.



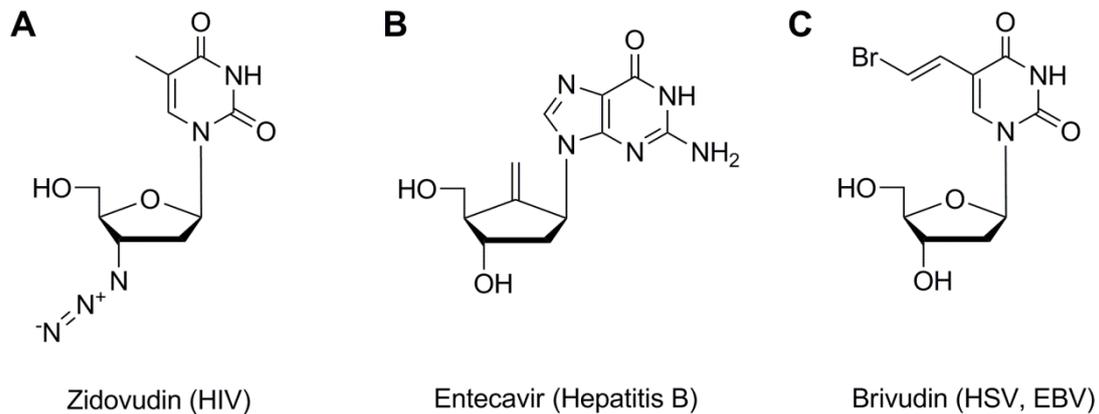
**Abbildung 8: Strukturen von Photosensibilisatoren Aptamer vermittelter PDT.** A) Chlorin e<sub>6</sub>. B) *meso*-Tetrakis(*N*-methyl-4-pyridiniumyl)porphyrin (T<sub>4</sub>MPyP).

Aptamere sind mehrfach für den zellspezifischen Transport von Photosensibilisatoren untersucht worden. So wurde das anionische Chlorin e<sub>6</sub> (Abbildung 8A) mit verschiedenen Aptameren als kovalentes Konjugat verwendet [134, 180, 181]. Alternativ wurde die physikalische Kopplung des kationischen Photosensibilisators T<sub>4</sub>MPyP (Abbildung 8B) beschrieben. T<sub>4</sub>MPyP bindet Nucleinsäuren, bevorzugt G-Quadruplexe, über Stapelwechselwirkungen. Das Nucleolin bindene DNA-Aptamer AS1411 wurde als Träger von TMPyP4 für die selektive PDT in MCF7 Brustkrebszellen genutzt [125]. Neben Aptamer-Konjugaten wurden für die PDT auch bereits Konjugate natürlicher Rezeptorliganden (z. B. Transferrin) [182, 183] und Antikörper [184-186] beschrieben.

#### 1.4 Therapeutisch wirksame Nucleosid-Analoga

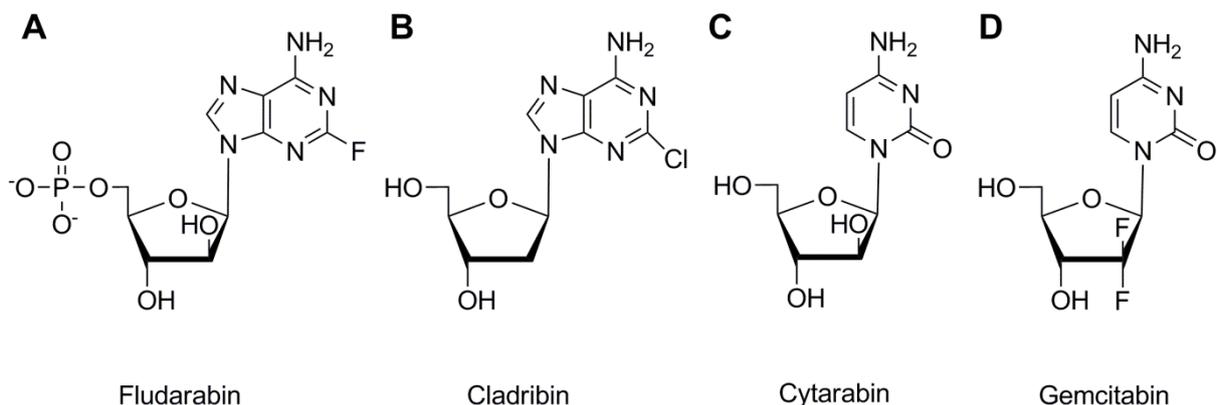
Nucleosid- Nucleotid- und Nucleobasenanaloga stellen eine Klasse von Arzneimitteln dar, die sich aufgrund struktureller Ähnlichkeiten kompetitiv zu den natürlichen Nucleinsäurebausteinen verhalten. Sie wirken hauptsächlich als Inhibitoren auf Enzyme, die Nucleinsäuren, Nucleoside oder Nucleotide modifizieren, wie z. B. Polymerasen, Helikasen oder virale Integrasen. Bei den meisten dieser Stoffe handelt es sich um Inhibitoren viraler Polymerasen, wie der Reversen Transkriptasen (RT). Sie kommen daher in der Behandlung von Infektionskrankheiten durch z. B. Herpesviren, Hepatitisviren oder das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zum Einsatz. Eine Auswahl prominenter Beispiele von antiviralen Nucleosid-Analoga ist in Abbildung 9 dargestellt.

Eine zweite therapeutisch relevante Gruppe sind zytotoxische Analoga. Diese werden als Chemotherapeutika in der Behandlung von Krebs eingesetzt. Die DNA-Replikation ist ein Ansatzpunkt der Chemotherapie, da Tumorzellen im Allgemeinen erhöhte Proliferationsraten besitzen.



**Abbildung 9: Nucleosid-analoge Inhibitoren viraler Polymerasen.** A) Zidovudin (3'-Azidothymidin, AZT) stellt den ältesten von acht zugelassenen Nucleosid-analogen Reverse Transkriptase-Inhibitoren für die HIV-Therapie dar [187]. Es ist analog zum Desoxythymidin und wird durch Kinasen zum aktiven Metabolit, dem 5'-Triphosphat umgesetzt. B) Entecavir ist ein Analogon des Desoxyguanosins, welches zur Behandlung von Hepatitis B verabreicht wird. Es wird intrazellulär durch Phosphorylierung in den aktiven RT- und DNA-Polymerase-Inhibitor metabolisiert [188]. C) Brivudin ist ein Virostatikum, das gegen Herpesviren (z. B. Herpes Simplex Typ 1, HSV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) eingesetzt wird. Gegen Herpesviren ist es mehr als 100-fach potenter als das üblicherweise eingesetzte Aciclovir. Bei Brivudin handelt es sich um einen Inhibitor viraler DNA-Polymerasen [189].

Eine Auswahl von chemotherapeutisch anwendbaren Analoga ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Viele von Ihnen werden zur Behandlung gastroenterologischer und lymphatischer Krebsformen verwendet [190]. Mit Gemcitabin wurde im Jahr 2012 erstmals ein chemotherapeutisches Nucleosid-Analogon für den Aptamer vermittelten Wirkstofftransport verwendet. Es wurde dabei in ein Oligonucleotid eingebaut, welches an das EGFR-Aptamer m07 hybridisiert und mit diesem in Pankreas-Tumorzellen aufgenommen wurde [119].

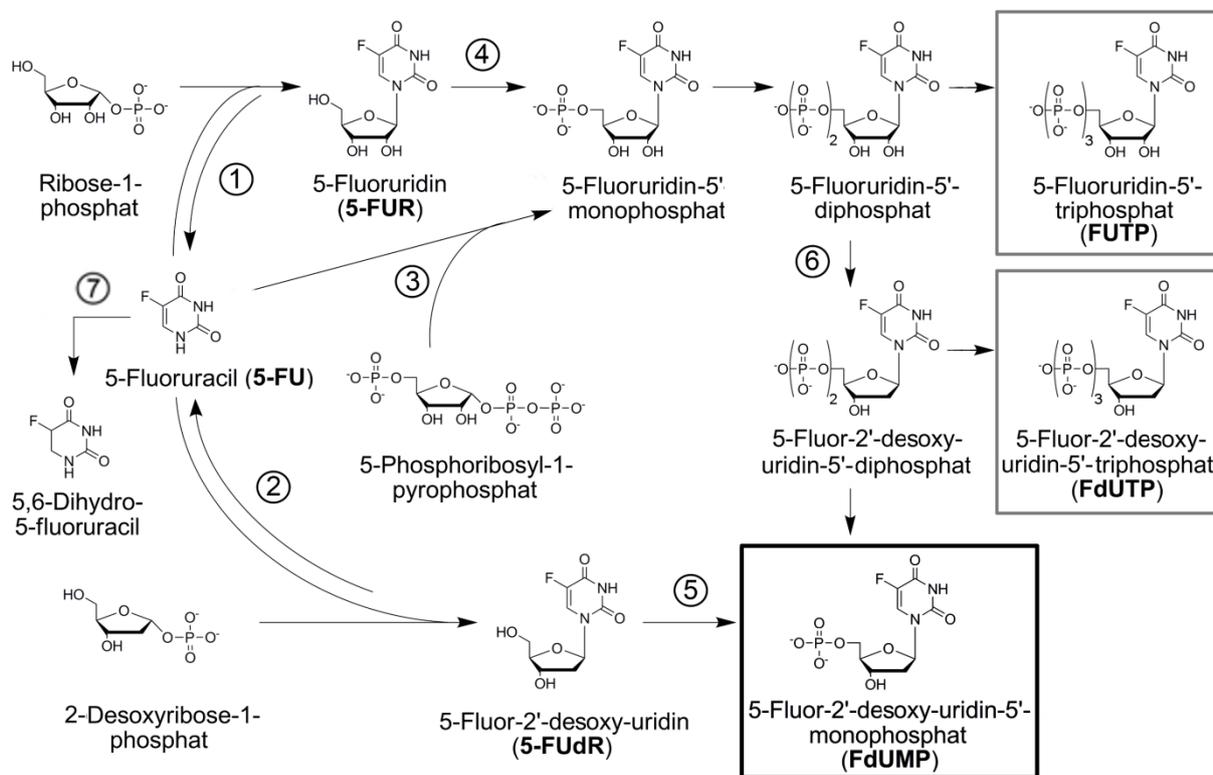


**Abbildung 10: Nucleosid- und Nucleotid-Analoga in der Chemotherapie.** A) Fludarabin ist ein Desoxyadenosin-Analogon, das in der Behandlung chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt wird. B) Cladribin stellt ein Analogon des Desoxyadenosins dar. Es wird zur Behandlung verschiedener Lymphome eingesetzt, da es nicht nur zytotoxisch sondern auch immunsuppressiv wirkt (durch Inhibition der Adenosin-Deaminase). Ihm wird auch ein therapeutisches Potential zur Behandlung von schubförmig-remittierender MS zugeschrieben. C) Cytarabin (araC) ist ein zytostatisches Analogon des Cytosins. Es wird vor allem zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie eingesetzt. D) Gemcitabin ist ein Cytosin-Analogon, welches zur Behandlung diverser Tumore innerer Organe wie der Bauchspeicheldrüse, der Lunge, der weiblichen Brust und der Blase eingesetzt wird.

### 1.4.1 5-Fluoruracil und dessen Nucleosid-Derivate

5-Fluoruracil (5-FU) ist eines der am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika bei vielen Krebsformen, wie kolorektalen Tumoren, Brustkrebs, Krebs der Bauchspeicheldrüse, des Kopfes und des Halses. Es wird seit über 50 Jahren als Zytostatikum angewendet [191].

Das therapeutische Potential von 5-FU basiert hauptsächlich auf drei Angriffspunkten auf die Vitalität und Proliferationsfähigkeit von betroffenen Zellen (Abbildung 11) [5]. Der Einbau von 5-FU-Metaboliten in RNA oder DNA (FUTP bzw. FdUTP) führt zu fehlerhafter RNA-Reifung [192] bzw. DNA-Strangbrüchen [193]. Den signifikantesten Einfluss übt 5-FU nach dessen Umsetzung zum Desoxyribonucleotid (FdUMP) aus, welches als starker Inhibitor der Thymidylat-Synthase (TS) fungiert, dem Schlüsselenzym der Thymidin *de novo* Biosynthese [194]. Daher wird anstelle von 5-FU auch das wirksamere Desoxynucleosid 5-FuDR (Floxuridin) eingesetzt.



**Abbildung 11. Metabolismus von 5-Fluoruracil (nach Pinedo und Peters [195]).** Die zytotoxischen Metabolite von 5-FU beinhalten FUTP, FdUTP und FdUMP (umrahmt). Das letztgenannte ist verantwortlich für den stärksten Effekt, durch Inhibition der Thymidylat-Synthase (TS). Während für diese Funktion verabreichtes 5-FU oder 5-FUR die Umsetzung durch mehrere Enzyme in den Zielzellen benötigt, genügt im Fall von 5-FuDR ein einziges Enzym, die Thymidin-Kinase (5), um FdUMP zu generieren. FUTP bzw. FdUTP dienen als Substrate für den Einbau in RNA oder DNA. Der Katabolismus verläuft hauptsächlich über die Reduktion von 5-FU durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (7). Weitere beteiligte Enzyme der einzelnen Schritte sind: 1 Uridin-Phosphorylase, 2 Thymidin-Phosphorylase, 3 Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, 4 Uridin-Kinase, 6 Ribonucleotid-Reduktase.

Um Nebenwirkungen zu vermeiden kann 5-FU als *Prodrugs* verabreicht werden, wie Capecitabin oder Tegafur, welche nur in bestimmten Zelltypen, z.B. Prostatakrebszellen, in eine aktive Form überführt werden [196]. Eine andere Strategie zur Vermeidung der Schädigung von Nicht-Zielzellen stellt der gezielte Wirkstofftransport dar. Derzeit befinden sich Nanopartikel, Nanogele oder Nanopolymere im Fokus der Forschung zum aktiven Transports von 5-FU [197]. Neben der Optimierung über *drug targeting* sind in den letzten Jahren verschiedene Oligomere von 5-FUdR untersucht worden, die in Zellversuchen z. T. größere zytotoxische Effekte aufwiesen als äquivalente Mengen des Monomers. Einer dieser Effekte beruht auf zusätzlicher Inhibition der Topoisomerase 1 durch ein Oligomere von 5-FUdR, bestehend aus zehn Nukleotiden [198]. Ebenso wurde ein synergistischer Effekt für 5-FUdR-modifizierte siRNAs, die gegen die mRNA der Thymidylat-Synthase gerichtet waren, nachgewiesen [199].

### 1.5 Analyse der atomaren Interaktionen in RNA-Protein-Komplexen

Die Charakterisierung von RNA-Protein-Komplexen (z. B. Aptamer-Protein-Komplexen) auf atomarer Ebene umfasst eine Reihe von Methoden. Der Röntgenkristallographie [200], der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) [201] und der Kryoelektronenmikroskopie [202] kommen Sonderrollen zu, da sie die Abbildung der Gesamtheit atomarer Strukturen von Biomolekülen erlauben. Sie werden daher am häufigsten zur direkten Strukturaufklärung eingesetzt und liefern zumeist auch die Informationsgrundlage anderer Methoden. Jedoch stellen sie vergleichsweise hohe Ansprüche an Stoffmenge, Stoffreinheit und technischer Expertise. Sinnvolle Alternativen oder Ergänzungen sind durch die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR oder EPR) [203, 204] und Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) basierte Methoden [205, 206] gegeben. Beide Techniken beruhen auf der Detektion der Wechselwirkungen von Sonden, mit denen eines oder beide Biomoleküle chemisch modifiziert werden.

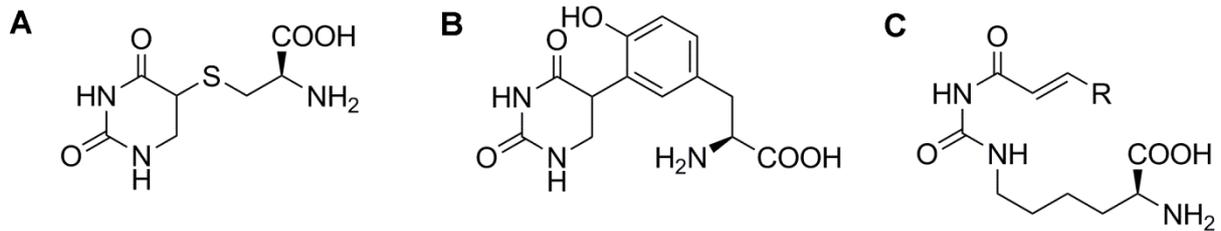
#### 1.5.1 Analyse von RNA-Protein-Interaktionen mittels kovalenter Verknüpfungen (*cross linking, XL*)

Das Erzeugen von kovalenten Verknüpfungen durch sogenanntes *cross linking* (XL) innerhalb von RNA-Protein-Komplexen erlaubt die Identifikation räumlich benachbarter Molekülreste in RNA-Protein-Komplexen. Die gängigste Form dieses Ansatzes bedient sich modifizierter Nukleobasen mit erhöhter Photoreaktivität unter UV-A- und UV-B-Strahlung ( $\lambda > 300$  nm) wie z. B. 4-Thiouridin, 5-Iod- oder 5-Bromuridin oder Arylazid-Derivaten der Nukleobasen [207-209]. Auch ohne diese Modifikation, die mitunter Faltung oder Bindung

der RNA beeinflussen können, ist es möglich durch Verwendung härterer UV-C-Strahlung (typischerweise  $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) [210] die kanonischen Nukleobasen zur Ausbildung kovalenter Bindungen mit Aminosäuren des Proteins anzuregen. Eingesetzt werden diese Methoden u. a. zur Analyse von Histon-DNA-Interaktionen [211], für das Screening von RNA-Bindeproteinen (z. B: *UV cross-linking and immunoprecipitation* [CLIP] [212]), sowie zur Strukturaufklärung von Protein-RNA-Interaktionen in Ribonukleoproteinen wie dem Ribosom [213, 214].

Von den 20 kanonischen Aminosäuren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen fünf übereinstimmend als besonders photoreaktiv unter UV-C-Strahlung identifiziert: reduziertes Cystein, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Lysin. (in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität) [209, 215, 216]. Daneben wurden für Histidin, Methionin und Leucin [209] sowie Glutaminsäure und Asparaginsäure [216] moderate Reaktivitäten gefunden. Auch wenn zur Identifikation von *cross-linking*-Bindungen in den computergestützten Datenbankanalysen zumeist Algorithmen verwendet werden, die sich auf die vorgenannten Aminosäuren beschränken, kann für Photoreaktionen keine der kanonischen Aminosäuren definitiv ausgeschlossen werden [207, 209, 215].

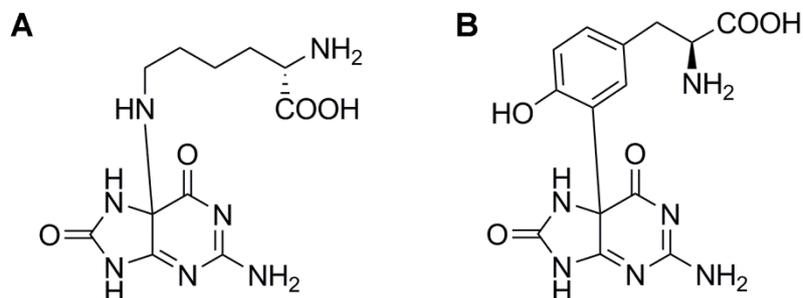
Uracil ist die reaktivste und am besten verstandene Nukleobase bezüglich ihrer Photoreaktionen mit Aminosäuren [217]. Es bildet bei 254 nm UV-Strahlung in abnehmender Reaktivität hauptsächlich stabile Addukte mit reduziertem Cystein, Tyrosin, Phenylalanin, Cystin, sowie in geringerem Maß mit Histidin, Arginin und Lysin [218] (Abbildung 12). Dabei reagiert Uracil in radikalischer Weise an der 5-Position mit Cystein oder Tyrosin (Abbildung 12A und B). Uracil bzw. Uridin reagiert photoaktiviert mit Aminen durch eine basenkatalysierte nucleophile Substitution an der 2-Position. Diese ist für die  $\alpha$ -Aminogruppe verschiedener Aminosäuren nachgewiesen worden. Mit Lysin erfolgt die Reaktion bevorzugt durch die  $\epsilon$ -Aminogruppe. Das Reaktionsprodukt (Abbildung 12C) ist jedoch nur wenig stabil und neigt zur Zyklisierung unter Wärmezufuhr. Bei dieser Folgereaktion wird im Falle von Uridin Ribose eliminiert [219]. Nach analogem Reaktionsmechanismus wie für Lysin wurden auch für Tryptophan Photoreaktionen mit Thymin bzw. in geringerem Maß mit Uracil beschrieben [220].



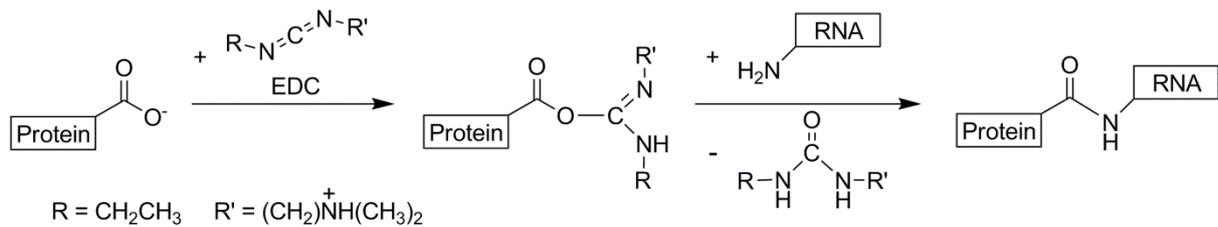
**Abbildung 12: Prominente UV-cross-linking-Produkte von Uracil bzw. Uridin.** A) Photoaddukt von Uracil mit reduziertem Cystein [221]. B) Photoaddukt von Uracil mit Tyrosin [222]. C) Photoaddukt von Uridin mit Lysin (nach Umlagerung) [219, 220]. Dieses Addukt zyklisiert bei Wärmezufuhr unter Eliminierung von Ribose. R = Ribose

Eine wichtige Nebenreaktion unter UV-Bestrahlung stellt die Photooxidation von Guanin zu 8-Oxoguanin dar [223], aus welcher *cross-linking*-Produkte mit Lysin [224] oder mit Tyrosin [225] erfolgen können (Abbildung 13). Analoge Adukte von Adenin nach Oxidation zu 8-Oxoadenin sind theoretisch möglich, jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Dies ist vor allem der wesentlich geringeren Oxidationsempfindlichkeit von Adenin gegenüber Guanin zuzuschreiben [226]. Als weitere Nebenreaktionen können die Thymin-Dimerisierung [227] in DNA bzw. verschiedene Formen der Uracil-Dimerisierung [228, 229] in RNA zu intramolekularem *cross linking* führen und dadurch zur Strukturaufklärung genutzt werden.

Alternativ zur UV-aktivierten Konjugation können chemisch aktivierte Verknüpfungen zur Identifikation von Nukleinsäure-Protein-Interaktionen genutzt werden. Eine verbreitete Methode ist die Aktivierung von Carbonsäuregruppen des C-Terminus' oder der Seitenketten von Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) [230]. Das kurzlebige O-Acylisoharnstoff-Derivat reagiert unter geeigneten EDC-Konzentrationen spezifisch mit der exozyklischen Aminogruppe räumlich naher Adenine oder Cytosine (Abbildung 14).



**Abbildung 13: Prominente UV-XL-Produkte von Guanin nach Oxidation zu 8-Oxoguanin.** Abgebildet sind jeweils die Primärprodukte, welche jeweils eine [1,2]-Umlagerung zu stabileren Spirohydantoinen eingehen. A) Photoaddukt von 8-Oxoguanin mit Lysin [224]. B) Photoaddukt von 8-Oxoguanin mit Tyrosin [225].



**Abbildung 14: EDC vermitteltes Cross Linking von RNA an Proteine.** Nach Aktivierung einer Carbonsäuregruppe des Proteins durch EDC entsteht ein reaktives und damit kurzlebige O-Acylisourea-Derivat, welches mit einer exocyclischen Aminogruppe der RNA-Basen zu einem Amid reagieren kann. In analoger Weise können auch organische Phosphate durch EDC aktiviert werden und XL-Produkte zur Folge haben.

Damit ist das *cross linking* mit EDC im Vergleich zu UV-aktivierten Konjugationen chemisch deutlich eingeschränkter. Gegenüber anderen chemischen Konjugationsmethoden, wie z. B. Schiffbasen-Konjugaten von Nukleotiden zu Lysinen nach Malaprade-Glycolspaltung [231], Lysin-Nukleobasen-Konjugation mit Diepoxybutan [232] oder Arginin-Guanin-Konjugation mit Bikethoxal [213], ist EDC-*cross-linking* jedoch deutlich effektiver und kommt daher auch heute noch in der Interaktionsanalyse zum Einsatz.

Zur primären Identifikation und zur Reinigung von RNA-Protein-Konjugaten wird deren verminderte elektrophoretische Mobilität (*Gelshift*) genutzt. Ein entsprechendes *cross-linking*-Produkt kann mittels radioaktiv markierter RNA detektiert werden [233]. Die Ermittlung der Nukleotidpositionen von *cross-linking*-Bindungen kann anschließend über die gelelektrophoretische Sequenzanalyse erfolgen. Die betroffenen Nukleotide erzeugen charakteristische Abbrüche für Fragmentierungen der RNA selbst (z. B. partielle alkalische Hydrolyse) [208, 234] oder für cDNA-Produkte aus der *Primer-Extension* mit reversen Transkriptasen [235].

Die am *cross linking* beteiligten Proteinabschnitte lassen sich durch proteolytische Spaltung des *cross-linking*-Produktes, sowie anschließender massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Fragmente bestimmen. Im Idealfall, wenn ein Fragment nur aus sehr wenigen Nukleotiden und Aminosäuren besteht, es isoliert und genügend angereichert werden kann, lässt sich dabei die *cross-linking*-Bindung einem Reaktionspaar von Nukleotid und Aminosäure exakt zuordnen [210].

### 1.5.2 Bevorzugte Wechselwirkungen in RNA-Protein-Interaktionen

Durch die Analyse der Proteinoberfläche können potentielle Nukleinsäurebindestellen, und damit auch Aptamerbindestellen, ermittelt werden. In Proteinen zeichnen sich nukleinsäurebindende Bereiche durch ein elektrostatisch positives Oberflächenpotential aus, sowie durch die Anwesenheit von Aminosäureresten mit hoher Tendenz zum Wechselwirken

mit Nucleinsäuren. In verschiedenen Studien sind die wechselwirkenden Reste von Nucleinsäuren und Proteinen hinsichtlich ihrer Häufigkeit in strukturell charakterisierten Komplexen untersucht worden [236-240].

Die neuste und umfangreichste dieser Studien [237] zeigte auf, dass Van-der-Waals-Wechselwirkungen zahlenmäßig häufiger präsent sind als Wasserstoffbrückenbindungen. Zudem erfolgen auf Seiten der RNAs häufiger Wechselwirkungen des Phosphordiesterückgrads als von den Nucleobasen und auf Seiten der Proteine häufiger Wechselwirkungen der Seitenketten als des Peptidrückgrads. Von den basenspezifischen Kontakten erfolgten die meisten von Guaninen oder Adeninen. Von den 20 kanonischen Aminosäuren zeigen Arginin, Histidin, Phenylalanin, Lysin und Tyrosin die häufigste Beteiligung an Nucleinsäurebindestellen. Das gehäufte Vorkommen von Arginin- und Lysin-Resten bedingt das charakteristische elektrostatisch positive Oberflächenpotential der Bindestellen. In fünf Studien wurden als bevorzugte Wechselwirkungspaare Arginin-Phosphat, Lysin-Phosphat, Tyrosin-Uracil, Phenylalanin-Adenin und Tryptophan-Guanin identifiziert. Eine Schlüsselrolle seitens der Aminosäuren kommt dabei Argininresten zu. Die Guanidinium-Gruppe des Arginins paart als doppelter Wasserstoffbrückendonator ideal mit Phosphaten (und damit dem Rückgrad von RNA) [236]. Diese Wechselwirkung wurde mit Abstand am häufigsten in Protein-RNA-Komplexen gefunden. Zudem interagiert Arginin auch häufig über Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken oder durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Nucleobasen [236, 239-241]. Aromatische Aminosäuren sind häufig an  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu den Nucleobasen beteiligt, mit den oben erwähnten präferierten Wechselwirkungspartnern. Aus den Informationen dieser statistischen Analysen sind in der Folge Algorithmen zur Vorhersage von RNA-Bindestellen in Proteinen hervorgegangen [242, 243]. Dies basiert zumeist auf dem Datenbankabgleich von Proteinsequenzabschnitten (z. B. PiRaNhA [244] und RNABindRPlus [243]). Die Schwäche dieser Berechnung durch Vernachlässigung der tatsächlichen Sekundärstruktur eines Proteins, soll künftig durch die Entwicklung eines Proteinoberflächen-orientierten Algorithmus' behoben werden. Die Grundlage wurde mit dem Erstellen einer umfassenden Datenbank aller bekannten Protein-RNA-Komplexe geschaffen (*Protein-RNA Interface Database*, PRIDB), die durch Metasuche die Vorhersage von RNA-Bindungsstellen ermöglichen soll [245]. Einige dieser Vorhersagemethoden können im Internet frei genutzt werden [246, 247].

In den bisher kristallisierten Aptamer-Protein-Komplexen sind einige der oben genannten Wechselwirkungen ebenfalls stark vertreten. So erfolgen die molekularen Bindungen im Fall des Thrombin-bindenden DNA-Aptamers mit  $\alpha$ -Thrombin maßgeblich durch Wechselwirkungen mit zwei Arginin- und einem Tyrosin-Rest [248] (PDB: 4DII). Für das Von-

Willebrand-Faktor-bindende Aptamer handelt es sich bei den direkt wechselwirkenden Aminosäuren neben Lysin-, Asparagin- und Glutamin-Resten um Phenylalanin und Arginin [249] (PDB: 3HXO). Für das NF-kappa B-bindende RNA-Aptamer interagieren Arginin-, Histidin-, Lysin- und Tyrosin-Seitenketten direkt mit der RNA [250] (PDB: 1OOA). In diesem Fall handelt es sich sogar um identisch orientierte Wechselwirkungen wie zu dem natürlichen Bindungspartner, der kappa B-DNA [251] (PDB: 2V2T). Die Bindestelle liegt dabei in der N-terminalen der zwei immunglobulinähnlichen Domänen des Proteins NF-kappa B.

## 2 ZIELSETZUNG

Aptamere, die an Zelloberflächenrezeptoren binden, eignen sich für den aktiven Transport von Wirkstoffen, wenn sie in das Zellinnere endozytiert werden. Mit dem RNA-Aptamer AIR-3 und seiner Verkürzung AIR-3A sind im Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Hahn Aptamere selektiert worden, die spezifisch an Zellen binden, die den humanen Interleukin-6-Rezeptor präsentieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sie in das Zellinnere internalisiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen Vorgang für den aktiven Wirkstofftransport nutzbar zu machen. Dazu wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Wirkstoffe mit AIR-3 oder AIR-3A konjugiert (siRNAs, der Photosensibilisator Chlorin e6 und die chemotherapeutisch wirksamen Nukleosid-Analoga 5-FUR und 5-FUdR). Durch Filterretentionsstudien sollte die Bindung dieser Konjugate an rekombinantes Zielprotein überprüft werden. Mittels fluoreszenzbasierter Methoden (konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie, Durchflusszytometrie) sollte der intrazelluläre Verbleib des aufgenommenen Aptamers untersucht und die Bindung der genannten Konjugate analysiert werden. Die zytotoxischen Effekte sollten mit verschiedenen Methoden belegbar sein, wie die Bestimmung der Zellvitalität mittels Proliferationsanalysen, die Analyse apoptischer Zellen und die Analyse der Zellzyklus-Fractionen der Zielzellen.

Desweiteren sollten die Kenntnisse über die molekulare Interaktion zwischen AIR-3A und dem Interleukin-6-Rezeptor erweitert werden. Mittels kovalenter Verknüpfung der beiden Moleküle und anschließender Fragmentierungen des Proteins oder der RNA sollten Hinweise auf Reste erbracht werden, die an der Bindung beteiligt sind.

### 3 MATERIAL

Verbrauchskemikalien und -materialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) und Appllichem (Darmstadt) bezogen.

#### 3.1 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	(Sigma Aldrich, München)
Alexa647-Hydrazid	(Thermo Scientific, Schwerte)
Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat (AlPcS <sub>4</sub> )	(Frontier Scientific, Logan, USA)
Chlorin e6	(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
Desoxythymidin	(Sigma-Aldrich, München)
Histofix-(4%ige Formaldehyd-Lsg. zur Zellfixierung)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Leucovorin (als racemisches Calcium-Salz)	(Sigma-Aldrich, München)
<i>meso</i> -Tetraphenylporphindisulfonat (TPPS <sub>2a</sub> )	(Frontier Scientific, Logan, USA)
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	(Sigma Aldrich, München)
Propidiumiodid	(Sigma-Aldrich, München)
Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxid)	(Biozol, Eching)

#### 3.2 Kits und Materialien

Nitrocellulose-Membran (0.45 µm)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Quantum™ MESF-Alexa647-Beads	(Bang Laboratories, Fishers, USA)
BioSpin® p6-Säulen	(Bio-Rad, München)

#### 3.3 Puffer, Medien und Lösungen

##### Puffer und Lösungen molekularbiologischer Arbeiten

MES-Puffer (100 mM, pH 6,0)	100 mM MES; 500 mM NaCl
10x Phosphatpuffer (1 M, pH 7,4)	500 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 500 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 M NaCl
3xTranskriptionspuffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,1), 2 mM Spermidin, 5 mM DTT, 0,01% Triton X-100, 1,5% PEG 6000

## MATERIAL

50x TAE	2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7,8
10x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
10x Selektionspuffer	10x PBS zuzüglich 30 mM MgCl <sub>2</sub>
Aminohexansäure-Lösung	20% Methanol; 40 mM 6-Aminohexansäure
<u>Puffer zur Fragmentierung von RNA</u>	
RNase T1-Sequenzierpuffer	7 M Harnstoff, 20 mM Natriumcitrat, pH 5,0
alkalischer Hydrolyse-Puffer	100 mM Natriumcarbonat, 2 mM EDTA, pH 9,5
Imidazolpuffer	2 M Imidazol, pH 7,0
<u>Puffer für die Elektrophorese</u>	
Denat. RNA-Probenpuffer	8 M Harnstoff, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM EDTA (pH 8,0), 0,025% Bromphenolblau(w/v), 0,025% (w/v) Xylencyanol
3x SDS-Proteinladepuffer (nicht reduzierend)	188 mM Tris-HCl (pH 6,8); 6% (w/v) SDS, 60% (v/v) Glycerin, 0,003% (w/v) Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer	125 mM Tris (pH 8,3), 0,96 M Glycin, 0,5% (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
<u>Lösungen für die Silberfärbung von Protein-Gelen</u>	
Fixierlösung	30% Ethanol, 15% Eisessig in dd H <sub>2</sub> O
Inkubationslösung	0,5 M Natriumacetat-Lösung mit 25% Ethanol, Zugabe von 50 mg NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und 125 µL Glutardialdehyd (25%) auf 25 mL dieser Lösung
Färbelösung	25 mg AgNO <sub>3</sub> in 25 mL ddH <sub>2</sub> O, Zugabe von 7,5 µL Formaldehyd (37%)
Entwicklerlösung	625 mg Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 25 mL ddH <sub>2</sub> O, Zugabe von 7,5 µL Formaldehyd (37%)
Stopp-Lösung	50 mM Na <sub>2</sub> EDTA-Lösung

## MATERIAL

### Zellkulturmedien:

*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), High Glucose (4,5 g/L), + L-Glutamin Hersteller: PAA Laboratories (Marburg)

*Roswell Park Memorial Institute Medium 1640* (RPMI 1640), + L-Glutamin Hersteller: PAA Laboratories (Marburg)

### Puffer und Lösungen zellbiologischer Arbeiten

Annexin-Bindepuffer 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4

Puffer zur Färbung von zellulärer DNA 0.1% (w/v) Triton X-100, 10 µg/mL Propidium-iodid, 100 µg/mL RNase A in PBS

## 3.4 Nukleotide

### 3.4.1 Nukleosidtriphosphate

ATP, CTP, GTP, UTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Carl Roth, Karlsruhe)  
2'-FCTP (Metkinen, Kuopio, Finland)  
5-FUTP, 5-FdUTP (Jena Bioscience, Jena)  
[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3,000 Ci/mmol) (Hartmann Analytic, Braunschweig)

### 3.4.2 Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten RNA-Oligonukleotide wurden in entsalzter Form von IBA Life Sciences (Göttingen) bezogen. Es wurden folgende synthetische RNA-oligonukleotide verwendet (angegeben in 5'-3'-Richtung):

AIR-3A GGGGAGGCUGUGGUGAGGG  
AIR-3A\_Atto647N Atto647N-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>- GGGGAGGCUGUGGUGAGGG  
AIR-3A-G17U\_Atto647N Atto647N-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>- GGGGAGGCUGUGGUGAUGG  
AIR-3A\_Alexa647 Alexa647-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>- GGGGAGGCUGUGGUGAGGG  
AIR-3A\_3'-Amino GGGGAGGCUGUGGUGAGGG-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>  
*shuffled* AIR-3A\_3'-Amino GGAGGGUUGGGGUGGCCGGA-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>

## MATERIAL

### 3.5 Längenstandards

RNA Low Range Ladder	(Thermo Scientific, Schwerte)
DNA Ultra Low Range Ladder	(Thermo Scientific, Schwerte)
Prestained Protein Ladder	(Thermo Scientific, Schwerte)

### 3.6 Proteine

#### 3.6.1 Enzyme

FirePol® DNA-Polymerase	(Solis Biodyne, Tartu, Estland)
T7-RNA-Polymerase Wildtyp	(AK Hahn, Daniela Ploen)
T7-RNA-Polymerase Variante Y639F	(AK Hahn, Thorsten Mix)
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	(Thermo Scientific, Schwerte)
<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	(Fermentas, St. Leon-Rot, )
RNase A	(Thermo Scientific, Schwerte)
RNase T1	(Thermo Scientific, Schwerte)
Trypsin/EDTA	(PAA Laboratories, Marburg)

#### 3.6.2 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper.**

Name	Wirt	Hersteller
anti-EEA1 (human, murin)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti Maus-IgG_FITC	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich (München)
anti-gp130 (human)	Maus, monoklonal	R&D Systems (Wiesbaden)
anti-IL-6R (human)	Maus, monoklonal	R&D Systems (Wiesbaden)
anti-Maus-APC	Ziege, polyklonal	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-MEK2 PLK1 (human, murin)	Kaninchen, monoklonal	AbFrontier (Seoul, Südkorea)
anti-Kaninchen-IgG_AP.	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich (München)
anti-Aktin (human, murin)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
anti-Maus-IgG-AP	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich (München)

## MATERIAL

### 3.6.3 Sonstige Proteine

Hyper-IL-6	(Conaris, Kiel)
humanes Interleukin-6 (rekombinant aus <i>E. coli</i> )	(Peprotech, Hamburg)
murines Interleukin-3	(Biozol, München)
Annexin V-FITC	(Imgenex, Odisha, Indien)

### 3.7 Zelllinien

BaF3/gp130/IL6R/TNF und BaF3/gp130 Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien KMS-12-BM, RPMI-8226 und U-266 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. F. A. Ayuk (Universität Hamburg, UKE) zur Verfügung gestellt.

Die humanen Zelllinien LAN-1 (Neuroblastom) und U937 (Lymphom) entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Hahn.

Die Zelllinien LNCaP und PC3 (humane Prostata-Krebszelllinien) wurden von Frau M.Sc. S. Besztejan (Universität Hamburg, AG Rentmeister) zur Verfügung gestellt.

### 3.8 Apparative Materialien

Tecan Infinite Plate-Reader	(Tecan, Männedorf)
Versadoc-Molecular Imager	(Bio-Rad, München)
Sequi-Gen GT System, -Sequenzierapparatur	(Bio-Rad, München)
NanoDropND-1000	(PeqLab, Erlangen)
FACScalibur Durchflusszytometer	(BD Biosciences, Heidelberg)
kLSM 510 ConfoCor2	(Zeiss, Jena)
Minifold® I Dot-Blot-System	(Schleicher & Schuell, Dassel)
UV-Handlampe (254 nm/366 nm, je 4 W)	(Peqlab, Erlangen)
Sterile Arbeitsbank für die Zellkultur	(Thermo Scientific, Schwerte)
Personal Molecular Imager FX, Phosphorimager	(Bio-Rad, München)
NanoDropND-1000	(PeqLab, Erlangen)
LED-Pflanzenwachstumslampe (14 W), 225-LEDs (660 nm und 450 nm, je 62mW)	(Lunartech über PEARL.GmbH, Buggingen)

### 3.9 Verwendete Software

Quantity-One 4.6.6	(Bio-Rad, München)
Cell-Quest-Pro	(BD Biosciences, Heidelberg)
GraphPad Prism 4.0	(GraphPad, La Jolla, USA)
Origin 8.5	(OriginLab, Northampton, USA)
PyMOL Molecular Graphics System 1.5.0.4	(Schrödinger,LLC; New York, USA)
flexAnalysis 3.0	(Bruker Daltonics, Billerica, USA)
GIMP 2.6.10	(Spencer Kimball, Peter Mattis)

## 4 METHODEN

### 4.1 Methoden zur Synthese, Reinigung und Analyse von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgten photometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem NanoDropND-1000 (PeqLab, Erlangen). Für die Berechnung der Massenkonzentrationen wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\varepsilon_{\text{ssRNA}} = 25 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} , \quad 1 \text{ OD}_{260} \text{ entspricht } 40 \text{ ng}/\mu\text{L ssRNA}$$

$$\varepsilon_{\text{ssDNA}} = 27 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} , \quad 1 \text{ OD}_{260} \text{ entspricht } 33 \text{ ng}/\mu\text{L ssDNA}$$

$$\varepsilon_{\text{dsDNA}} = 20 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} , \quad 1 \text{ OD}_{260} \text{ entspricht } 50 \text{ ng}/\mu\text{L dsDNA}$$

Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm ( $A_{260/280} \approx 2,0$ ) wurde als Indiz für die Reinheit verwendet.

Für alle Experimente wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet, welches zuvor mit 1% DEPC behandelt worden war (Inkubation unter Rühren über Nacht, anschließend Autoklavieren).

#### 4.1.1 *In vitro*-T7-Transkription

Die Synthese einzelsträngiger RNA erfolgte enzymatisch unter Verwendung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem T7 Bakteriophagen. Als Template wurden PCR-Produkte oder Hybridisierungsprodukte käuflich erworbener DNA-Oligonukleotide verwendet (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Zusammensetzung eines *in vitro*-T7-Transkriptionsansatzes.**

Komponente	Volumen / $\mu\text{L}$	Endkonzentration
DNA-Templat	10	~ 0,5 $\mu\text{M}$
3xTranskriptionspuffer	33	1x
MgCl <sub>2</sub> (500 mM)	15-25	15-25 mM
NTP-Mix* (je 25 mM)	5	1,25 mM
T7-RNA-Polymerase	2,5	> 1 U/mL
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 100 $\mu\text{L}$	

\* NTP-Mix: jeweils 25 mM ATP, CTP, GTP und UTP

Die Transkriptionsansätze wurden für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA gelelektrophoretisch analysiert bzw. präparativ gereinigt (siehe Abschnitt 4.1.5).

#### 4.1.2 *In vitro*-T7-Transkription unter Verwendung modifizierter Nukleotide

Zur Synthese von einzelsträngiger RNA, die mit 5-FUR modifiziert war, wurden die Komponenten aus Tabelle 5 verwendet, mit Austausch von UTP gegen 5-FUTP.

Zur Synthese von einzelsträngiger RNA, die mit 5-FUdR modifiziert war, wurde die Variante Y639 der T7-RNA-Polymerase anstelle des Wildtyp-Enzyms verwendet. Diese Variante toleriert 2'-modifizierte Pyrimidin-Nukleosidtriphosphate als Einbausubstrate. Anstelle von UTP wurde 5-FdUTP eingesetzt. Die Synthese von RNA, die mit 5-FUdR und 2'-Fluorcytidin (2'-FC) modifiziert war, wurde analog hergestellt, indem zusätzlich CTP durch 2'-FCTP ausgetauscht wurde (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammensetzung eines *in vitro*-T7-Transkriptionsansatzes unter Verwendung 2'-modifizierter Pyrimidin-Nukleosidtriphosphate.**

Komponente	FUdR	FUdR & 2'-FC	Endkonzentration
DNA-Templat	10 µL	10 µL	~ 0,5 µM
3xTranskriptionspuffer	33 µL	33 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (500 mM)	20 µL	20 µL	20 mM
ATP, GTP (je 25 mM)	8	8	2 mM
5-FdUTP (10 mM)	5 µL	5 µL	0,5 mM
CTP (25 mM)	8 µL	-	2 mM
2'-FCTP (25 mM)	-	5 µL	1 mM
T7-RNA-Polymerase (Y639F)	5 µL	5 µL	> 1 U/mL
Pyrophosphatase (0,1 U/mL)	1 µL	1 µL	1 U/mL
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 100 µL	ad 100 µL	

Die Transkriptionsansätze wurden für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA gelelektrophoretisch analysiert bzw. präparativ gereinigt (siehe Abschnitt 4.1.5).

#### 4.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse und präparativen Reinigung einzelsträngiger Nukleinsäuren wurden Gele mit Harnstoff als denaturierendes Additiv und unterschiedlichem Anteil an Polyacrylamid (PAA) verwendet (siehe Tabelle 7). Die Herstellung der Gele erfolgte durch radikalische Polymerisation wässriger Lösungen von Acrylamid mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator, initiiert durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS).

Tabelle 7: Zusammensetzungen und Dimensionen der verwendeten denaturierenden PAA-Gele.

Komponente	analytisch	präparativ	zur Sequenzanalyse (19 nt RNA)
TAE-Puffer	1x	1x	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid 19:1 (w/v)	10-20 nt: 15-20% > 20 nt: 10%	10%	17,5%
Harnstoff	8 M	8 M	8 M
TEMED (v/v)	0,1%	0,1%	0,1%
APS (w/v)	0,7%	0,7%	0,7%
Gelformat	130 x 80 x 0,75 mm	245 x 180 x 1,5 mm-	210 x 500 x 0,5 mm
limitierte Leistung der Elektrophorese	12 W	25 W	50 W

Für die Analyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren wurden entsprechende Gele ohne Harnstoff verwendet.

#### 4.1.4 Detektion von Nukleinsäuren

Die Detektion von Nukleinsäuren in PAA-Gelen erfolgte entsprechend der verwendeten Markierung auf unterschiedliche Weise. Unmarkierte Nukleinsäuren wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid und Anregung mit UV-Licht (~325 nm) in einer Versadoc-Geldokumentationsanlage (Bio-Rad, München) detektiert oder anhand der Nukleinbasenabsorption vor einem fluoreszenten Hintergrund (*UV-Shadowing*) sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 4.1.5).

Fluoreszmarkierte RNAs mit Alexa647, Atto647N oder Chlorin e6 konnten ebenfalls in der Versadoc Geldokumentationsanlage detektiert werden, unter LED-Anregung (635 nm) und Fluoreszenzdetektion im roten Bereich (695BP55). Lösungen von diesen RNAs konnten zudem photometrisch mit einem NanoDropND-1000 (PeqLab, Erlangen) oder einem Tecan Infinite Plate-Reader (Tecan, Männedorf) quantifiziert werden.

Radioaktiv markierte RNAs wurden autoradiographisch detektiert. Hierfür wurden Gele oder Membranen auf einem PhosphorImager-Schirm exponiert und anschließend mit einem Molecular Imager FX (Bio-Rad, München) ausgelesen.

#### 4.1.5 Reinigung von Nukleinsäuren mittels Diffusionselution aus PAA-Gelen

Die präparative Reinigung von Nukleinsäuren erfolgte im Anschluss an eine Gelelektrophorese (Abschnitt 4.1.3). Über die UV-Absorption der Nuklobasen konnten

größere Mengen von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen detektiert werden. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese in einen seitlich aufgeschnittenen transparenten Autoklavierbeutel überführt und auf eine fluoreszente Silicaplatte gelegt. Unter Bestrahlung mit einer UV-Handlampe erschienen die Nukleinsäurebereiche des Gels als Schatten auf der Silicaplatte (*UV-Shadowing*). Die entsprechenden Bereiche wurden markiert, ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) überschichtet. Unter ständigem Schütteln wurden diese Proben für mindestens 1 h bei 60 °C inkubiert (Elution).

Die überstehenden Lösungen der Nukleinsäuren wurden anschließend mit dem 2,5-fachen Volumen kaltem Ethanol versetzt (im Falle geringer Nukleinsäuremengen wurde 1 µL einer gesättigten Glycogen-Lösung als Co-Präzipitat zugefügt) und bei -20 °C für mindestens 2 h zur Fällung inkubiert. Anschließend wurde die präzipitierte Nukleinsäure durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 16.000xg) pelletiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde durch Überschichten mit 100 µL 70%igem eiskaltem Ethanol und anschließender Zentrifugation (5 min, 4 °C, 16.000xg) gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Nukleinsäurepellet an der Luft getrocknet und in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 4.2 Methoden zur RNA-Modifikation

### 4.2.1 Radioaktive Markierung des 5'-Terminus mit <sup>32</sup>P-Phosphat

Die 5'-terminale radioaktive Markierung setzt einen unphosphorylierten 5'-Terminus voraus. Oligonukleotide, die mittels *in vitro*-T7-Transkription hergestellt worden waren (siehe Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2), wurden daher zunächst dephosphoryliert. Dies erfolgte enzymatisch durch die *shrimp alkaline phosphatase* (SAP, siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Reaktionsansatz zur 5'-terminalen Dephosphorylierung von RNA.**

Komponente	Menge/Volumen	Endkonzentration
RNA	10 -200 pmol	1-20 µM
10xSAP-Puffer	1 µL	1x
SAP-Enzym	1 µL	
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 10 µL	

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch Inkubation für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

## METHODEN

Zur Markierung wurden Aliquots dieser Lösung oder einer wässrigen Lösung synthetisch hergestellter RNAs verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte durch das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) aus dem T4 Bakteriophagen unter Verwendung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  als radioaktives Substrat (siehe Tabelle 9).

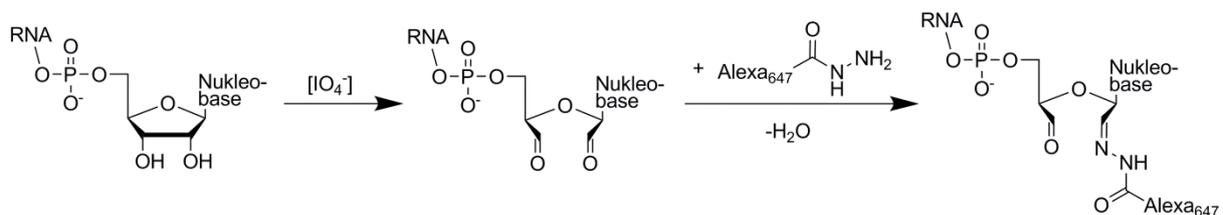
**Tabelle 9: Reaktionsansatz für die 5'-terminale radioaktive Markierung.**

Komponente	Menge/Volumen	Endkonzentration
RNA	10 pmol	1 $\mu\text{M}$
10xPNK-Puffer	1 $\mu\text{L}$	1x
PNK-Enzym	1 $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	2 $\mu\text{L}$	1,3 $\mu\text{M}$
DEPC behandeltes $\text{H}_2\text{O}$	ad 10 $\mu\text{L}$	

Der Reaktionsansatz wurde für 45 h bei 37 °C inkubiert, die RNA anschließend durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt und mittels Gelelektrophorese und Diffusionselution gereinigt (siehe Abschnitt 4.1.5).

### 4.2.2 Fluoreszenzmarkierung des 3'-Terminus' mit Alexa Fluor 647

Die posttranskriptionale Fluoreszenzmarkierung von RNA erfolgte durch Glycolspaltung des 3'-terminalen Nukleosids mit Natriumperiodat (nach Malaprade, siehe Tabelle 10) und anschließender Kopplung mit Alexa647-Hydrazid zu einem Hydrazon (siehe Tabelle 11 und Abbildung 15).



**Abbildung 15: Reaktionen der 3'-terminalen Fluoreszenzmarkierung.** Nach oxidativer Glycolspaltung durch Periodat erfolgt die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa647 über eine Hydrazon-Kopplung.

**Tabelle 10: Reaktionsansatz für die 3'-terminale Glycolspaltung von RNA.**

Komponente	Menge/Volumen	Endkonzentration
RNA	600 pmol	15 $\mu$ M
wässriges NaIO <sub>4</sub> (1 M)	6 $\mu$ L	150 mM
NaOAc-Lösung (0,3 M, pH 5,2)	13 $\mu$ L	100 mM
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 40 $\mu$ L	

Die Reaktionslösung wurde im Dunklen bei RT für 2,5 h unter ständigem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Periodat durch Zugabe von 6  $\mu$ L einer 2 M KCl-Lösung gefällt und durch Zentrifugation (20 min, RT, 16.000xg) entfernt. Der Überstand wurde durch eine p6-Biospin® Größenausschluss säule gereinigt. Für RNAs < 30 nt wurde dieser Schritt aufgrund des *Cut-Offs* von ca. 6 kDa ausgelassen. Die aus der Glycolspaltung erhaltene Lösung wurde direkt zur Hydrazonkopplung verwendet.

**Tabelle 11: Reaktionsansatz der Hydrazonkopplung 3'-terminal oxidiertes RNA.**

Komponente	Menge/Volumen	Endkonzentration
oxidierte RNA	40 $\mu$ L (~600 pmol)	12,6 $\mu$ M
Alexa647-Hydrazid (10 mM)	6 $\mu$ L	1,26 mM
NaOAc-Lösung (3 M, pH 5,2)	1,5 $\mu$ L	100 mM

Die Reaktionslösung wurde im Dunklen bei RT für 4,5 h unter ständigem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 125  $\mu$ L Ethanol und Inkubation bei -20 °C über Nacht gefällt. Überschüssiges Alexa647-Hydrazid verblieb größtenteils in Lösung. Die RNA wurde anschließend durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 16.000xg) pellettiert und nach Verwerfen des Überstandes über ein 10 %iges denaturierendes PAA-Gel gereinigt. Die Ausbeute der Markierung betrug 63%, bezogen auf die zurückgewonnene RNA (photometrisch bestimmt, siehe Abschnitt 4.1 bzw. 4.1.4).

#### 4.2.3 Konjugation 3'-terminal amino-modifizierter RNA mit Chlorin e6

Zu 10  $\mu$ L *N*-Hydroxysuccinimid-Lösung (50 mM) in MES-Puffer (100 mM, pH 6,0) wurden mit 10  $\mu$ L Chlorin e6 (50 mM in DMSO) vorgelegt. Nach Zugabe von 10  $\mu$ L EDC-Lösung (100 mM in DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O) wurde die Reaktionslösung durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und umgehend mit 110  $\mu$ L einer Lösung 3'-amino-modifizierter RNA (10 nmol, in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Diese Lösung wurde zur Vervollständigung der Reaktion 1 h bei

RT inkubiert. Überschüssiges freies Chlorin e6 sowie freie Reaktanden wurden durch dreimalige Ethanolfällung auf Eis entfernt. Die Zugabe von MES-Puffer zur ersten Fällungsreaktion erhöhte die Löslichkeit des freien Chlorin e6 und erleichterte dadurch dessen Abtrennung.

Nach Aufnahme in DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O wurde die Reinheit des Konjugates gelelektrophoretisch überprüft (15% denat. PAA) und die Ausbeute photometrisch bei  $\lambda_{\text{abs}} = 400\text{nm}$  überprüft. Es wurden hierbei Ausbeuten von 62-70% bezogen auf die eingesetzte RNA erhalten.

### 4.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen und kovalenten Konjugaten von Proteinen und RNA erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-PAGE. Die Gele hatten das Format 130 x 80 x 0,75 mm und setzten sich aus einem fokussierenden Sammelgel (siehe Tabelle 12) und einem separierenden Trenngel (siehe Tabelle 13) zusammen, beiderseits Tirs-gepuffert.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels.**

Komponente	Endkonzentration
4x Sammelgelpuffer	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	4%
TEMED (v/v)	0,1%
APS (w/v)	0,7%

**Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels.**

Komponente	Endkonzentration
4x Trenngelpuffer	1x
Polyacrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	8-10%
TEMED (v/v)	0,1%
APS (w/v)	0,7%

## METHODEN

Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgte die Denaturierung und die Addition negativer Ladungen an Proteinen, so dass deren elektrophoretische Mobilität mit ihrem Molekulargewicht korreliert war. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 3x SDS-Proteinladepuffer versetzt und 2 min bei 80-95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (Tris/Glycin-gepuffert) bei 180 V.

### 4.3.2 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung

Die Färbung von Proteinen erfolgte durch die Reduktion von gebundenen Silberionen zu elementarem Silber [252]. Hierfür wurden zunächst die elektrophoretisch getrennten Proteine in den SDS-PAA-Gelen durch Inkubation für mindestens 1 h in einer frisch angesetzten wässrigen Lösung von 30% Ethanol und 15% Essigsäure (Eisessig) fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 1-12 h in 25 mL einer wässrigen 0,5 M Natriumacetat-Lösung mit 25% Ethanol inkubiert, der 50 mg Natriumthiosulfat (Endkonzentration: 10 mM) und 125 µL einer 25%igen Glutardialdehyd-Lösung zugesetzt wurde (Inkubations-Lösung). Nach dreimaligem Waschen für je zehn Minuten mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel in 25 mL einer Färbelösung mit 25 mg Silbernitrat (Endkonzentration: 6 mM) und 7,5 µL einer 37%igen wässrigen Formaldehyd-Lösung für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Entwicklung durch Zugabe von 25 mL einer wässrigen Lösung von 625 mg Natriumcarbonat (Endkonzentration: 24 mM) und 7,5 µL einer 37%igen wässrigen Formaldehyd-Lösung. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Zugabe einer 50 mM Dinatrium-EDTA-Lösung gestoppt.

## 4.4 Methoden zur Analyse von RNA-Molekülen und deren Interaktion mit Proteinen

### 4.4.1 Bestimmung der Stabilität von RNA-Molekülen

Zur Bestimmung der Stabilität von RNA-Fragmenten, wurden Aliquots radioaktiv markierter RNA verwendet. Diese wurden in je 5 µL Zellkulturmedium bei Ab- bzw. Anwesenheit von fötalem Kälber Serum (FKS, 10% v/v im Medium) für definierte Zeit bei 37 °C inkubiert. Die Hydrolysereaktionen wurden durch Zugabe von 5 µL denaturierendem RNA-Probenpuffer und Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff gestoppt. Bis zur gelelektrophoretischen Analyse wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.4.2 Analyse von RNA-Protein-Interaktionen mittels Filterretentionsstudien

Die Affinität von RNA-Molekülen zu Proteinen wurde durch die Retention von RNA-Protein-Komplexen an einer Nitrocellulose-Membran überprüft. Hierfür wurden konstante Mengen radioaktiv markierter RNA (< 1 nM) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins (0-500 nM) in Selektionspuffer (PBS inkl. 3 mM MgCl<sub>2</sub>) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden diese Lösungen durch eine mit Aminohexansäure-Puffer präinkubierte Nitrocellulose-Membran (0.45 µm, Carl Roth) in einer Vakuum-Apparatur (Minifold® I Dot-Blot-System; Schleicher & Schuell) filtriert und die Membran viermal mit Selektionspuffer gewaschen. Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet. Es wurde für die spätere Quantifizierung mehrmals eine definierte Menge an radioaktiv markierter RNA direkt auf nicht verwendete Bereiche der Membranoberfläche pipettiert. Die Detektion erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.4. Aus dem Anteil radioaktiv markierter RNA wurden die Dissoziationskonstanten  $K_d$  nach folgender Formel berechnet:

$$RNA_{\text{gebunden}} = \frac{B_{\text{max}} \times c_{\text{Protein}}}{K_d + c_{\text{Protein}}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit  $B_{\text{max}}$  = maximal gebundener RNA-Anteil.

#### 4.4.3 Cross Linking von Hyper-IL-6 mit radioaktiv markierter RNA

##### 4.4.3.1 Cross Linking durch UV-Aktivierung

Zur Konjugation proteingebundener RNA wurde radioaktiv markierte RNA (Endkonzentration < 200 nM) mit Hyper-IL-6 (Endkonzentration: 0,5-1 µM) in 1x Selektionspuffer für 20 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurde diese Lösung auf einen auf Eis gekühlten Objektträger pipettiert. Mit einer UV-Handlampe ( $\lambda = 254$  nm, 4 Watt output;  $\lambda = 336$  nm, 4 Watt output) im Abstand von ca. 3 cm oberhalb des Objektträgers wurde diese Probe für 5-30 min bestrahlt. Hierbei wurden für längere Bestrahlungszeiten (> 10 min) zwar höhere Ausbeuten von RNA-Protein-Konjugaten registriert, jedoch führte dies in Folge von Proteinaggregation ebenso zu Protein-Protein-Verknüpfungen. Die Analyse des Reaktionsproduktes erfolgte im Anschluss durch SDS-PAGE (Abschnitt 4.3.1.).

##### 4.4.3.2 Cross Linking durch EDC

Zur Konjugation Proteingebundener RNA wurde radioaktiv markierte RNA (< 1 pmol, Endkonzentration < 200 nM) mit ca. 8 pmol Hyper-IL-6 (Endkonzentration: 1,6 µM) in 1x Selektionspuffer in einem Gesamtvolumen von 5 µL für 20 min an RT präinkubiert. Anschließend wurden 5 µL einer frisch hergestellten Lösung von 100 mM EDC in DEPC

behandeltem ddH<sub>2</sub>O zu diesem Ansatz pipettiert. Nach 20 Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µL einer 1 M Glycin-Lösung gestoppt. Alternativ zu Glycin wurde auch die Zugabe von 100 mM Tris (pH 7,4), 10x PBS sowie 5%ige 2-Mercaptoethanol-Lösung (0,7 M) zum Stoppen der Reaktion untersucht. Die Analyse des Reaktionsproduktes erfolgte im Anschluss durch SDS-PAGE (Abschnitt 4.3.1.).

### 4.4.4 Methoden zur Fragmentierung von RNA

#### 4.4.4.1 RNA-Fragmentierung durch partielle alkalische Hydrolyse

Die Fragmentierung durch partielle alkalische Hydrolyse wurde genutzt, um Fragmentleitern für Sequenziergelen herzustellen. Es wurden 0,5-1 pmol 5'-terminal radioaktiv markierter RNA in 5 µL alkalischem Hydrolyse-Puffer (100 mM Natriumcarbonat-Puffer, 2 mM EDTA) für 5 min bei RT und anschließend für 10 min bei 90°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µL einer 100 mM Tris-Pufferlösung (pH 7,4) gestoppt. Bis zur Verwendung wurden die Fragmentlösungen auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.4.4.2 RNA-Fragmentierung durch RNase T1

Die Fragmentierung durch RNase T1 wurde genutzt, um definierte Fragmente zur Bestimmung der Nukleotidpositionen in Sequenziergelen herzustellen. Es wurden 0,5-1 pmol 5'-terminal radioaktiv markierter RNA und ein 100-facher Überschuss unmarkierter RNA (tRNA o. Ä.) in 5 µL RNase T1-Sequenzierpuffer (7 M Harnstoff, 20 mM Natriumcitrat pH 5.0) vorgelegt und zum Denaturieren für 2 min auf 60 °C erhitzt. Die Spaltung wurde durch Zugabe von 0,5 U RNase T1 eingeleitet und nach 15 min Inkubation bei RT durch Zugabe von 5 µL einer 100 mM Tris-Pufferlösung (pH 7,4) gestoppt. Bis zur Verwendung wurden die Fragmentlösungen auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.4.4.3 RNA-Fragmentierung durch RNase A

Die partielle Fragmentierung durch RNase A wurde genutzt, um definierte Fragmente zur Bestimmung der Nukleotidpositionen in Sequenziergelen herzustellen. Es wurden 0,5-1 pmol 5'-terminal radioaktiv markierter RNA in 10 µL einer 100 mM Tris-Pufferlösung vorgelegt und die Spaltung durch Zugabe von 1 µL einer frisch hergestellten Verdünnung von RNase A (10 pg/µL) eingeleitet. Nach Inkubation für 2 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µL denaturierendem RNA-Probenpuffer gestoppt. Bis zur Verwendung wurden die Fragmentlösungen auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt.

## METHODEN

Um UV-XL-Produkte vollständig mit RNase A zu degradieren, wurde analog verfahren. Hierbei wurde allerdings ein Überschuss des Enzyms verwendet (ca. 100 ng Enzym pro zum *cross linking* eingesetzten pmol RNA) und die Inkubation mit dem Enzym auf 20 min verlängert.

### 4.4.4.4 RNA-Fragmentierung durch Imidazol

Die Fragmentierung durch Imidazol wurde als alternative Methode zur partiellen alkalischen Hydrolyse genutzt, um Fragmentleitern aus freier RNA oder UV-XL-Konjugaten herzustellen [253].

Für die Fragmentierung freier RNA wurden 0,5-1 pmol 5'-terminal radioaktiv markierter RNA in 10 µL Imidazol-Puffer (2 M Imidazol, pH 7,0) für 12 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µL gesättigte Glycogen-Lösung zugegeben und die RNA durch Zugabe von 100 µL eiskaltem Aceton mit 2% (w/v) Lithiumperchlorat auf Eis für 30 min gefällt. Nach Zentrifugieren (15 min, 4 °C, 15.000xg) wurde das Pellet mit 100 µL eiskaltem Aceton gewaschen und die Probe für weitere 5 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die RNA an der Luft getrocknet und in denaturierendem RNA-Ladepuffer aufgenommen.

Im Falle eines UV-XL-Produktes wurde die Fragmentierung in einem SDS-PAA-Gelstück der elektrophoretisch getrennten *Cross Linking*-Probe durchgeführt. Das Gelstück wurde hierfür zunächst in einem Probengefäß dreimal mit 2x Imidazol-Puffer (4 M Imidazol) gewaschen und dann mit 15 µL ddH<sub>2</sub>O sowie 15 µL 2x Imidazol-Puffer getränkt. Anschließend wurde das Probengefäß für 12 min bei 90°C inkubiert. Zur Elution der Fragmente wurden 100 µL ddH<sub>2</sub>O zugefügt und das Probengefäß über Nacht bei 4 °C auf einem Thermoschüttler (550 rpm) inkubiert. Nach Überführen der Elutionslösung in ein neues Probengefäß wurde 1 µL gesättigte Glycogen-Lösung zugegeben und die RNA-Fragmente durch Zugabe von 500 µL eiskaltem Aceton mit 2% (w/v) Lithiumperchlorat bei -20 °C für 2 h gefällt. Hiernach schloss sich die gleiche Behandlung wie für freie RNA an.

## 4.5 Zellbiologische Methoden

### 4.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden unter Zusatz von Penicillin (60mg/L Kulturmedium), Streptomycin (100 mg/L Kulturmedium) und fötalem Kälberserum (FKS, 10%, wenn nicht anders angegeben) bei 37 °C und einer 5%-CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre kultiviert.

## METHODEN

**BaF3/gp130/IL6R/TNF $\alpha$**  (Zytokin-abhängige murine prä-B-Zelllinie, stabil transfiziert mit den humanen Oberflächenproteinen gp130, IL-6R und TNF $\alpha$ , Suspensionszellen); Kultivierung in DMEM unter Zusatz von 10 ng hIL-6 pro mL Kulturmedium. Zelldichte:  $1 \cdot 10^4$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Passagieren durch Verdünnungen bis zu 1:100. Verdopplungszeit: 12 h.

**BaF3/gp130** (Zytokin-abhängige murine prä-B-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem humanen Oberflächenprotein gp130, Suspensionszellen); Kultivierung in DMEM unter Zusatz von 10 ng mL-3 oder 10 ng Hyper-IL-6 pro mL Kulturmedium. Zelldichte:  $1 \cdot 10^4$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Passagieren durch Verdünnungen bis zu 1:100. Verdopplungszeit: 12 h.

**RPMI-8226** (humanes multiples Myelom, Suspensionszellen mit Neigung zum Adhären) Kultivierung in RPMI. Zelldichte:  $1 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL, ideal:  $5 \cdot 10^5$  Zellen/mL. Passagieren durch 1:2-Verdünnung alle 3 Tage. Verdopplungszeit: 60-70 h.

**U-266** (humanes multiples Myelom, Suspensionszellen mit Neigung zur Clusterbildung) Kultivierung in RPMI. Zelldichte:  $1 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL, ideal:  $2 \cdot 10^5$  Zellen/mL. Passagieren durch Verdünnung bis zu 1:2 alle 3 Tage. Gegen Clusterbildung alle 1-2 Tage durch Pipettieren resuspendieren. Verdopplungszeit: 55 h.

**KMS-12-BM** (humanes multiples Myelom, Suspensionszellen): Kultivierung in RPMI mit 20% FKS. Zelldichte:  $5 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Passagieren durch Verdünnung bis zu 1:2 alle 2-3 Tage. Verdopplungszeit: 60 h.

**U-937** (humanes histiozytisches Lymphom, Monozyten, Suspensionszellen): Kultivierung in RPMI. Zelldichte:  $1 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Passagieren durch Verdünnung bis zu 1:10. Mediumwechsel alle 3-4 Tage. Verdopplungszeit: 24 h.

**LNCaP** (humanes Prostatakarzinom, adhären): Kultivierung in RPMI mit 20% FKS. Passagieren bei Konfluenz 1:3 bis 1:10 durch Trypsin/EDTA. Mediumwechsel alle 2-3 Tage. Verdopplungszeit: 60 h.

**PC3** (humanes Prostatakarzinom, adhären): Kultivierung in RPMI. Passagieren bei Konfluenz 1:3 bis 1:10 durch Trypsin/EDTA. Mediumwechsel alle 2-3 Tage. Verdopplungszeit: 60 h.

**LAN-1** (humanes Neuroblastom, adhären): Kultivierung in RPMI. Passagieren bei Konfluenz 1:2 bis 1:3 durch Trypsin/EDTA. Mediumwechsel alle 3-4 Tage. Verdopplungszeit: 100 h.

### 4.5.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wurden diese in suspenderter Form für 5 min bei 4 °C und 300xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in vorgekühltem Einfriermedium (üblicherweise 90% des jeweiligen Kulturmediums + 10 % DMSO) resuspendiert. Es wurden  $2 \cdot 10^6$  bis  $5 \cdot 10^6$  Zellen á 1 mL in 2-mL-Kryoröhrchen aliquotiert und diese in einer auf 4 °C vorgekühlten mit Isopropanol befüllten Kryobox auf -80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden diese Aliquots (Kryostock) zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Zum Auftauen von Zellen wurde ein Kryostock soweit angetaut, dass sich der noch größtenteils gefrorene Inhalt in ein steriles Zentrifugationsgefäß mit 5 mL Medium stürzen ließ. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 300xg wurde der Überstand verworfen, das erhaltene Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in ein T25-Kulturgefäß ausgesät.

### 4.5.3 *in vitro*-PDT

Es wurden  $1 \cdot 10^5$  IL-6R-positive BaF3-Zellen serumfrei gewaschen und zur Aufnahme des freien Photosensibilisators (Chlorin e6) oder dessen Aptamer-Konjugat (AIR-3A-ce6) für 45 min bei 37 °C in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min bei 4 °C und 300xg) und in 1 mL frisches Vollmedium in einer 24-well-Platte resuspendiert. In dieser wurden sie für 55 min auf einer LED platziert und mittels dieser bestrahlt (660 nm,  $90 \text{ J/cm}^2$  bei einer Bestrahlungsdichte von ca.  $30 \text{ mW/cm}^2$ ). Die Vitalität der Zellen wurde direkt im Anschluss durchflusszytometrisch unter Färbung apoptotischer und nekrotischer Zellen ermittelt (Abschnitt 4.5.5.4). Als Kontrollen dienten analog behandelte Zellen, die in der Inkubation keine Photosensibilisator-Spezies erhielten, anstelle der LED-Exposition im Dunklen inkubiert wurden oder den IL-6R nicht präsentierten.

### 4.5.4 Aptamer vermittelte Aufnahme therapeutischer Nukleosid-Analoga

Es wurden  $1 \cdot 10^5$  IL-6R-positive BaF3-Zellen gewaschen (dreimal mit serumfreiem DMEM inkl. 0,5% Rinderserum-Albumin; BSA) und zur Aufnahme des Therapeutikums in 100  $\mu\text{L}$  DMEM inkl. 0,5% BSA, hIL-6 (10 ng/mL) und 250 nM AIR-3-FdU resuspendiert. Nach Inkubation bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  für 45 min wurde die FdU-beinhaltenden RNA in drei Schritten durch Verdünnung und Zentrifugation soweit entfernt, dass keine unspezifischen Effekte des Therapeutikums nachgewiesen werden konnten. Im Anschluss wurden die Zellen in einer 96-well-Platte in 100  $\mu\text{L}$ -Aliquots mit einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL ausgesät und bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Bestimmung der relativen Zellproliferation

(Abschnitt 4.5.7) und die Analyse der Zellzyklusfraktionen (Abschnitt 4.5.5.5) erfolgte zu Zeitpunkten bis zu 44 h nach der Inkubation.

### 4.5.5 Durchflusszytometrische Analysemethoden

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine schnelle Analyse vieler tausender Zellen bezüglich deren Fluoreszenz- und Lichtstreuverhalten, unter dem Einsatz fluoreszenter Markermoleküle. Dabei werden Zellen in ein Kapillarsystem eingespeist, um, nach der Fokussierung durch einen Hüllstrom, einzeln einen Fluoreszenz-aktivierenden Laserstrahl zu passieren. Die registrierten Fluoreszenzintensitäten mehrerer tausend Zellen werden anschließend zu zwei- oder mehrdimensionalen Histogrammen verarbeitet.

In dieser Arbeit wurde ein Durchflusszytometer des Typs FACScalibur von der Firma Becton & Dickinson zur Bestimmung zellulär gebundener Antikörper oder RNA-Moleküle, sowie zur Analyse apoptotischer Zellen und der Verteilung der Zellzyklusfraktionen verwendet.

#### 4.5.5.1 Nachweis von Zelloberflächenproteinen durch Antikörper

Der Nachweis von humanem IL-6R und humanem gp130 auf der Zelloberfläche erfolgte durchflusszytometrisch unter Verwendung von Antikörpern. Hierfür wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 350  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  des primären murinen Antikörpers (anti-IL-6R bzw. anti-gp130; finale Konzentration ca. 0,3 ng/ $\mu\text{L}$ ) wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Allophycocyanin-markierten (APC) sekundären Antikörper (anti-Maus-APC, 1  $\mu\text{L}$  auf 350  $\mu\text{L}$  Zellsuspension) für 30 min auf Eis. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 350  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Histogramm-Auftragung wurden 10.000 Zellen vermessen.

#### 4.5.5.2 Bindungsanalyse fluoreszenzmarkierter RNA

Zur Analyse der Bindung fluoreszenzmarkierter RNA an Zellen wurden  $1 \cdot 10^5$  bis  $5 \cdot 10^5$  Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 150-350  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Nach Zugabe einer definierten Menge markierter RNA (finale Konzentrationen: 1-200 nM) wurden die Zellen für 10 min auf Eis oder bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 350  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Histogramm-Auftragung wurden mindestens 10.000 Zellen vermessen.

#### 4.5.5.3 Indirekte Bindungsanalyse unmarkierter RNA

Die Analyse der Bindung nicht fluoreszenzmarkierter Aptamervarianten von AIR-3 (z. B. AIR-3-FdU) wurde indirekt durch Konkurrenz mit fluoreszenzmarkiertem AIR-3A bestimmt. Um die Rezeptorinternalisierung zu verhindern war es notwendig, alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchzuführen. Es wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen serumfrei gewaschen und anschließend in PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen (1-200 nM) von AIR-3-FdU für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin einmal mit PBS gewaschen und dann mit AIR-3A\_Atto647N in einer Sättigungskonzentration (100 nM) für 20 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 350  $\mu$ L PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Histogramm-Auftragung wurden mindestens 10.000 Zellen vermessen.

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  wurde aus dem Rückgang der Fluoreszenzintensität ( $F$ ) mit steigender Konzentration der unmarkierten Aptamervariante bestimmt, nach der Formel:

$$F = \frac{B_{\max} \times c_{5\text{-FdU-AIR-3}}}{K_d + c_{5\text{-FdU-AIR-3}}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit  $B_{\max}$  = maximale mittlere Fluoreszenzintensität.

#### 4.5.5.4 Nachweis apoptotischer Zellen durch Färbung mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte durchflusszytometrisch durch Zellfärbung mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC. Es wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen gewaschen und in 100  $\mu$ L Annexin-Bindepuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4) aufgenommen. Hierzu wurden 5  $\mu$ L Annexin V-FITC-Lösung und 1  $\mu$ L einer Propidiumiodid-Lösung (100  $\mu$ g/mL) gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 400  $\mu$ L Annexin-Bindepuffer zugegeben und die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gehalten.

Für die Detektion von Annexin V-FITC ( $\text{em}_{\max}$ : 530 nm; positiv für früh- und spät-apoptotische Zellen sowie nekrotische Zellen) wurde Kanal FL-1 (BP 530/30) des Durchflusszytometers (FACScalibur) verwendet. Die Detektion von Propidiumiodid ( $\text{em}_{\max}$ : 600 nm; positiv für spät-apoptotische und nekrotische Zellen) erfolgte über Kanal FL-2 (BP 585/42). Da FITC auch in FL-2 detektiert wird, wurde dieser Kanal entsprechend kompensiert. Zur Etablierung der idealen Kompensation wurden Zellen verwendet, in denen Apoptose über UV-Bestrahlung (1 min, 254 nm, 4W) oder Hitzestress (1 h, 43 °C) induziert worden war. Diese Zellen wurden für die Etablierung der idealen Geräteeinstellungen ungefärbt, doppelt gefärbt und jeweils einfach gefärbt analysiert.

### 4.5.5.5 Zellzyklusanalyse

Zur Bestimmung der anteiligen Zellzyklusfraktionen wurden  $5 \cdot 10^4$  bis  $2 \cdot 10^5$  Zellen mit PBS gewaschen und in 100  $\mu$ L PBS resuspendiert. Durch Zugabe des neunfachen Volumens von eiskaltem 70%igen Ethanol und anschließender Inkubation für mindestens 2 h bei 4 °C wurden diese fixiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 300xg), der Ethanolüberstand gründlich entfernt und in 1 mL PBS aufgenommen. Nach 30-60 s Inkubation bei RT wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 300xg) und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen durch Aufnahme in eine Färbelösung (0.1% Triton X-100, 10  $\mu$ g/mL Propidiumiodid und 100  $\mu$ g/mL RNase A in PBS) permeabilisiert und ihre DNA gefärbt. Die Zellen wurden in dieser Lösung für 10 min bei 37 °C oder für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bis zur Analyse auf Eis gehalten.

Der DNA-Gehalt konnte anschließend durchflusszytometrisch durch die Detektion des Propidiumiodids (FL-2, linearer Modus) analysiert werden. Zelltrümmer wurden über *gating* der Laser-Streuung (Dot-Plot FSC vs. SSC) ausgeschlossen. Zelldoubletten (fälschliche G<sub>2</sub>/M-Zellen) wurden durch *gating* der Signalthöhe gegen die Signalfäche des Kanals FL-2 (Dot-Plot FL-2-height vs. FL-2-area) ausgeschlossen.

### 4.5.6 Fluoreszenzmikroskopische Analysemethoden

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt unter der Verwendung fluoreszenter Marker oder fluorszenzmakierter Biomoleküle, die Visualisierung einzelner Kompartimente oder Bestandteile von Zellen. Durch eine konfokale Optik (durch Verwendung einer Lochblende im Fokus zweier optischer Linsen) ist neben der x,y-Fokussierung auch eine Fokussierung in der Tiefe des Präparates (z-Ebene) möglich. Dies erlaubt die Unterscheidung von Signalen aus der Ebene der Zelloberfläche von denen aus dem Zellinneren.

In dieser Arbeit wurde ein konvokales Laser-Scanning-Mikroskop (kLSM) von Typ LSM 510 ConfoCor2 der Firma Zeiss verwendet, um fluoreszenzmarkierte RNA, den Photosensibilisator Chlorin e6, sowie unterschiedliche fluoreszente Marker innerhalb von Zellen zu visualisieren (Einstellungen siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und zugehörige Einstellungen des kLSM.**

Fluorophor	markiertes Biomolekül	Methode	Zell-status	Mikroskop-Einstellungen
FITC	sekundärer Antikörper	Visualisierung des frühen Endosoms	fixiert	Laser: 488 nm, 5,9% Laserstärke; HFT 488, LP 505, ph = 200 µm
Atto647N	AIR-3A	intrazelluläre Aptamer-Visualisierung	lebend bzw. fixiert	Laser: 633 nm, 10% Laserstärke; HFT 514/633 (NFT 545*), LP 650, ph = 216-240 µm
Chlorin e6	AIR-3A bzw. freies Molekül	intrazelluläre Chlorin e6-Visualisierung	lebend	Laser: 633 nm, 10% Laserstärke; HFT 514/633, LP 650, ph = 216 µm
TPPS <sub>2a</sub>	freies Molekül	Visualisierung des späten Endosoms und Lysosoms	lebend	Laser: 458 nm, 34% Laserstärke; HFT 458, LP 585, ph = 256 µm
AlPcS <sub>4</sub>	freies Molekül	Visualisierung des späten Endosoms und Lysosoms	lebend	Laser: 633nm, 10% Laserstärke; HFT 514/633, LP 650, ph = 240 µm

HFT = Hauptfarbteiler

NFT = Nebendarbteiler

LP = Langpassfilter

ph = pinhole (Lochblendendurchmesser)

TPPS<sub>2a</sub> = *meso*-Tetraphenylporphindisulfonat

AlPcS<sub>4</sub> = Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat

\* nur für simultane Detektion von TPPS<sub>2a</sub> verwendet

#### 4.5.6.1 Fluoreszenzfärbung des frühen Endosoms

Für die simultane Visualisierung von AIR-3A und dem frühen Endosom in BaF3-Zellen wurden zunächst zur Internalisierung des Aptamers 2·10<sup>5</sup> Zellen serumfrei gewaschen und mit 50 nM AIR-3A\_Atto647N in Selektionspuffer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 4 °C, 500xg) und das erhaltene Zellpellet nochmals mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation in 4%iger Formaldehyd-Lösung (HistoFix) zuzüglich 0,1% (w/v) Saponin oder 100%igem Methanol für 15 min auf Eis fixiert und permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit Selektionspuffer erfolgte die immunhistochemische Färbung des frühen Endosom Antigens 1 (EEA1). Hierfür wurden die Zellen in mit 2 µL anti-EEA1-Antikörper in 100 µL PBS inkl. 0,1% (w/v) Gelatine (Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit 1:500 verdünntem Sekundärantikörper anti-Maus-FITC in PBS für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und zwischen zwei Objektträger für die Konfokalmikroskopie präpariert.

#### 4.5.6.2 Fluoreszenzfärbung des späten Endosoms und Lysosoms

Zur Visualisierung des späten Endosoms und Lysosoms wurden BaF3-Zellen für 30 h in Anwesenheit von 0,1 µg AIPcS<sub>4</sub> oder TPPS<sub>2a</sub> pro mL Zellkulturmedium kultiviert. Die Fluoreszenz der beiden Stoffe konnte über einen Zeitraum von mindestens 24 h nach der Aufnahme in etwa 1 µm großen Vesikeln der Zellen detektiert werden.

Für TPPS<sub>2a</sub> konnte simultan die Fluoreszenz von AIR-3A\_Atto647N detektiert werden. Hierfür wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Kultivierung mit TPPS<sub>2a</sub> (0,5 µg/mL Medium) serumfrei gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit 50 nM AIR-3A\_Atto647N in PBS inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurden diese in PBS resuspendiert, auf Eis gehalten und zur Mikroskopie direkt auf einen Objektträger für die Konfokalmikroskopie pipettiert.

#### 4.5.7 Proliferationsassay

Die Bestimmung der relativen Zellproliferation von BaF3-Zellen erfolgte durch Zugabe des Redoxindikators Resazurin. Es wurden je 10 µL Resazurin-Lösung zu 100 µL Zellkultursuspension gegeben und in Abhängigkeit von der Zelldichte 1-4 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert bis für die 100%-Lebendkontrolle ein sichtbarer Farbumschlag von blau zu violett erfolgt war. Die Zellzahl lag zum Zeitpunkt der Zugabe von Resazurin bei 2·10<sup>5</sup> bis 1·10<sup>6</sup> Zellen/mL Kulturmedium. (So wurden z. B. Proliferationsmessungen über 44 h mit 10.000 Zellen in 100 µL zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> begonnen.) Die Aufnahme und intrazelluläre Reduktion von Resazurin erlaubte eine Quantifizierung lebender Zellen anhand der Fluoreszenzintensität der reduzierten Form des Indikators, Resorufin (ex: 590 nm, em: 560 nm). Diese erfolgte durch Auslesen in einer schwarzen blickdichten Multiwell-Platte an einem TECAN Infinite Plate-Reader.

## 5 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, das in früheren Studien von Cindy Meyer, Katja Eydeler und Eileen Magbanua beschriebene RNA-Aptamer AIR-3 bzw. seine Verkürzung AIR-3A (beide spezifisch bindend an den humanen Interleukin 6-Rezeptor; hIL-6R) bezüglich seiner Eignung für den spezifischen Transport von Therapeutika in hIL-6R positive Zellen zu untersuchen. Zudem wurden Studien durchgeführt, die Aufschluss über die Bindungsgrenzfläche zwischen dem verkürzten RNA-Aptamer AIR-3A und Hyper-IL-6, einer Variante des Zielproteins hIL-6R, geben.

### 5.1 Analyse der Bindung von AIR-3A an die Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL-6R\_TNF $\alpha$

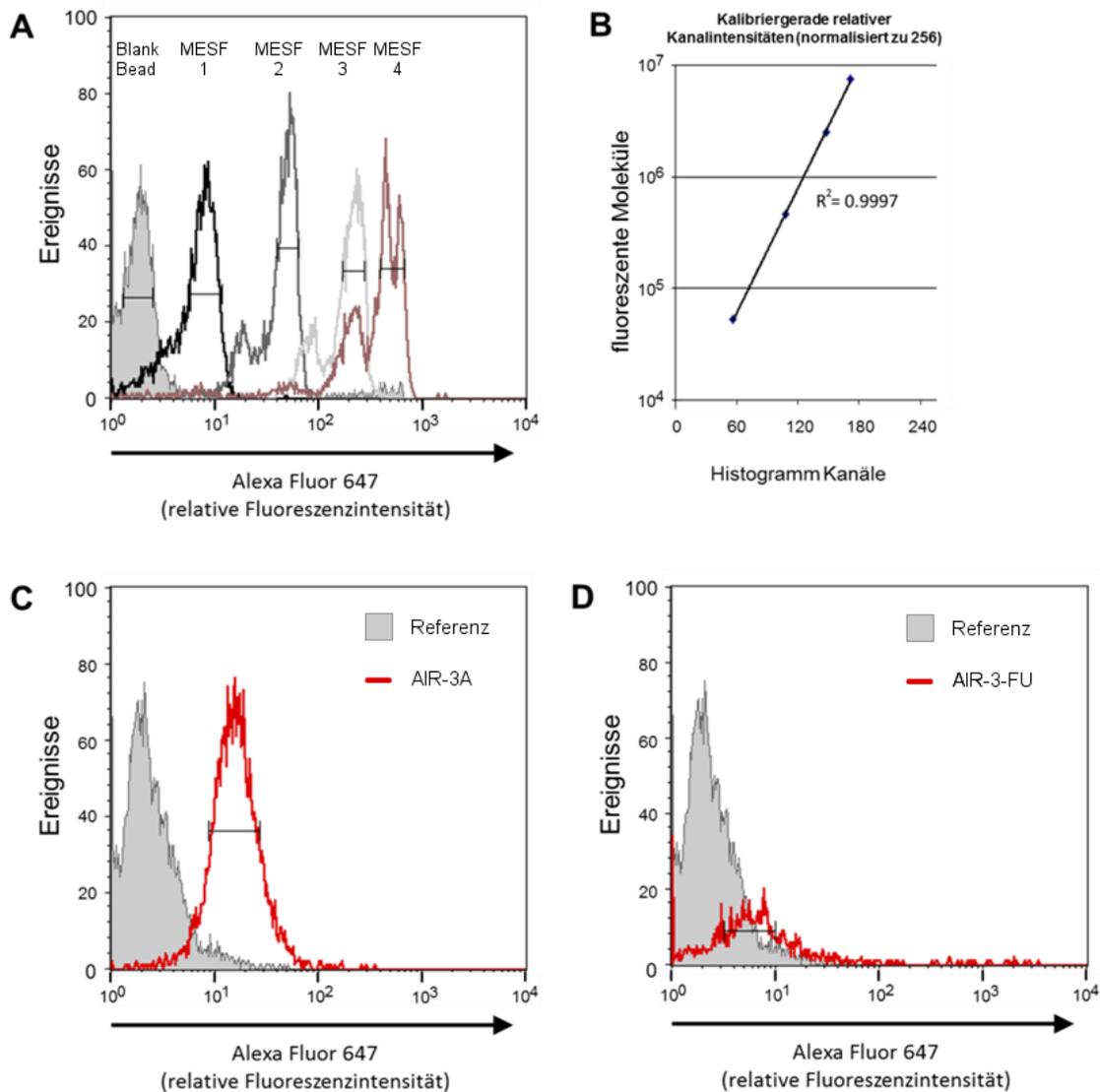
#### 5.1.1 Quantifizierung der gebundenen AIR-3A Moleküle

Die Anzahl pro Zelle gebundener AIR-3A-Moleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurden MESF Beads mit definierter Stoffmenge an Alexa Fluor 647 durchflusszytometrisch vermessen (Abbildung 16A) und aus den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten (FL-4) eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 16B). Im Anschluss wurden hIL-6R positive BaF3-Zellen nach Inkubation mit Alexa Fluor 647 markiertem AIR-3A unter identischen Einstellungen des Durchflusszytometers vermessen (Abbildung 16C). Zusätzlich wurden hIL-6R positive BaF3-Zellen nach Inkubation mit Alexa Fluor 647 markiertem AIR-3-FU vermessen (Abbildung 16D). Hierbei wurden die Inkubations- und Waschbedingungen so gewählt, dass sie denen des Zytotoxizitätstests mit AIR-3-FU (siehe Abschnitt 5.4.5) entsprachen. Die ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten sowie die aus ihnen berechneten Moleküläquivalente sind in Tabelle 15 wiedergegeben.

**Tabelle 15: Daten zur Quantifizierung zellgebundener Aptamere mittels Durchflusszytometrie**

Probe	fluoreszente Moleküle	relative Fluoreszenzintensität
Blank Bead	-	1,89
Bead #1 (MESF 1)	5.280	7,91
Bead #2 (MESF 2)	45.860	50,03
Bead #3 (MESF 3)	249.683	214,80
Bead #4 (MESF 4)	745.342	486,97
AIR-3A_5'-Alexa Fluor 647	<b>11.122</b>	15,04
AIR-3-FU_3'-Alexa Fluor 647	<b>3.746</b>	6,04

## ERGEBNISSE



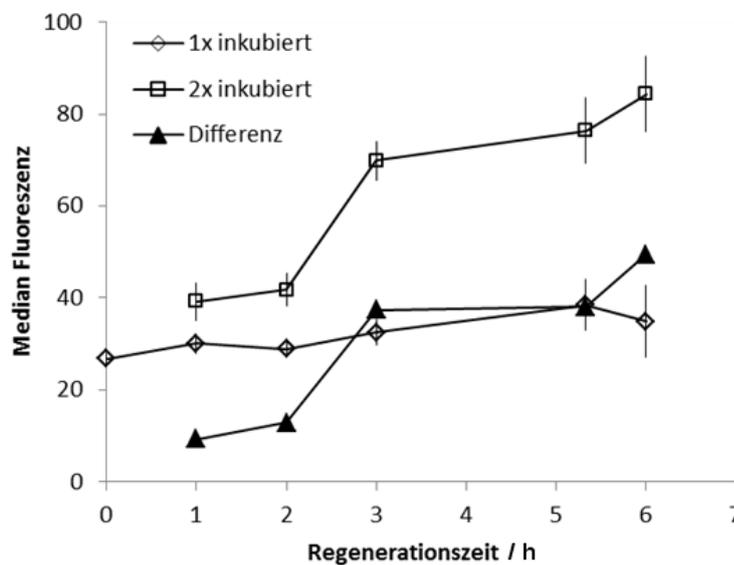
**Abbildung 16: Quantifizierung zellgebundener Aptamere mittels Durchflusszytometrie.** A) Zur Ermittlung der pro Zelle gebundenen Aptamereinheiten wurde eine Reihe mesoporöser Partikel mit definierter Fluorophormenge durchflusszytometrisch vermessen (MESF Beads-Alexa Fluor 647). B) Aus den arithmetischen Mittelwerten der vermessenen Partikel wurde eine Kalibriergerade erstellt. C) hIL-6R positive Zellen (BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ ) wurden anschließend mit AIR-3A\_Alexa Fluor 647 (50 nM; Sättigungskonzentration) auf Eis inkubiert und mit den identischen Geräteeinstellungen vermessen. D) hIL-6R positive Zellen (BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ ) wurden ebenso mit AIR-3-FU\_Alexa Fluor 647 (100 nM, 30 min 37 °C, anschließend dreimal gewaschen mit PBS) inkubiert und vermessen.

### 5.1.2 Zeitlicher Verlauf des Bindungspotentials durch Rezeptorregeneration

Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurde der zeitliche Verlauf der Anzahl an hIL-6R auf der Oberfläche von BaF3\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  Zellen ermittelt. Es wurden Zellen zum Zeitpunkt  $t_0$  mit fluoreszenzmarkiertem AIR-3A in PBS auf Eis inkubiert (50 nM), so dass alle auf der Zelloberfläche zugänglichen hIL-6R-Moleküle mit dem Aptamer abgesättigt wurden. Anschließend wurden die Zellen in DMEM (inklusive FKS und IL-6) für ein bis sechs Stunden kultiviert (Regenerationszeit). Im Anschluss wurden die Zellen

## ERGEBNISSE

erneut mit fluoreszenzmarkiertem AIR-3A inkubiert und die Fluoreszenzintensität der Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Als Referenz wurden Zellen parallel dem gleichen Setup unterzogen, mit dem Unterschied, dass sie in der ersten Inkubationsphase ( $t_0$ ) in PBS ohne fluoreszenzmarkiertes AIR-3A inkubiert wurden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensitäten gegen die Regenerationszeit sind in Abbildung 17 wiedergegeben. Danach erfolgte innerhalb der ersten drei Stunden der Regenerationszeit ein kontinuierlicher Anstieg des Fluoreszenzunterschieds der beiden Reihen ( $\blacktriangle$  Differenz). Im Zeitintervall von drei bis sechs Stunden stellte sich annähernd ein Plateau für Fluoreszenzunterschied ein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nach drei Stunden für die Zelllinie BaF3\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  die maximale Regeneration des hIL-6R an der Zelloberfläche erfolgte.



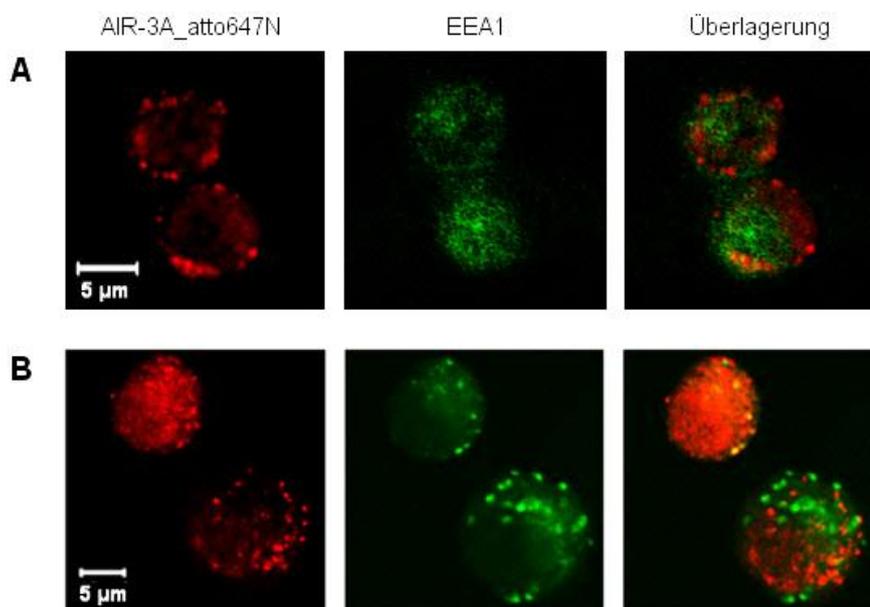
**Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der IL6-Rezeptorregeneration.** Zur Ermittlung der Regeneration von hIL-6R-Einheiten an der Zelloberfläche wurden zwei Reihen von Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zum einen wurden hIL-6R positive Zellen (BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ ) für 15 min bei 37 °C in serumfreiem Medium mit AIR-3A\_Atto647N (50 nM) inkubiert, anschließend einmal gewaschen und für 1-6 h (Regenerationszeit) in serumhaltigem Medium kultiviert. Daraufhin wurden diese Zellen erneut für 15 min bei 37 °C in serumfreiem Medium mit AIR-3A\_Atto647N (50 nM) inkubiert. ( $\square$  2x inkubiert). Zum anderen wurden parallel hierzu Zellen in gleicher Weise behandelt, jedoch ohne AIR-3A\_Atto647N in der ersten Inkubationsphase ( $\diamond$  1x inkubiert). Neben den Fluoreszenzintensitäten der beiden Reihen ist außerdem noch deren Differenz angegeben, die der Zunahme an in der zweiten Inkubationsphase gebundenem Aptamer entspricht [ $\blacktriangle$  Differenz = ( $\square$  2x inkubiert) - F( $\diamond$  1x inkubiert)]. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

### 5.1.3 Co-Lokalisation von internalisiertem AIR-3A

Zur Klärung der intrazellulären Lokalisation von endozytiertem AIR-3A wurden Färbungen des frühen Endosoms und des späten Endosoms bzw. Lysosoms durchgeführt. Die Fluoreszenz von Atto674N-markiertem AIR-3A und den jeweiligen Kompartimentfärbungen wurden simultan mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert.

### 5.1.3.1 Co-Lokalisation von AIR-3A im frühen Endosom der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$

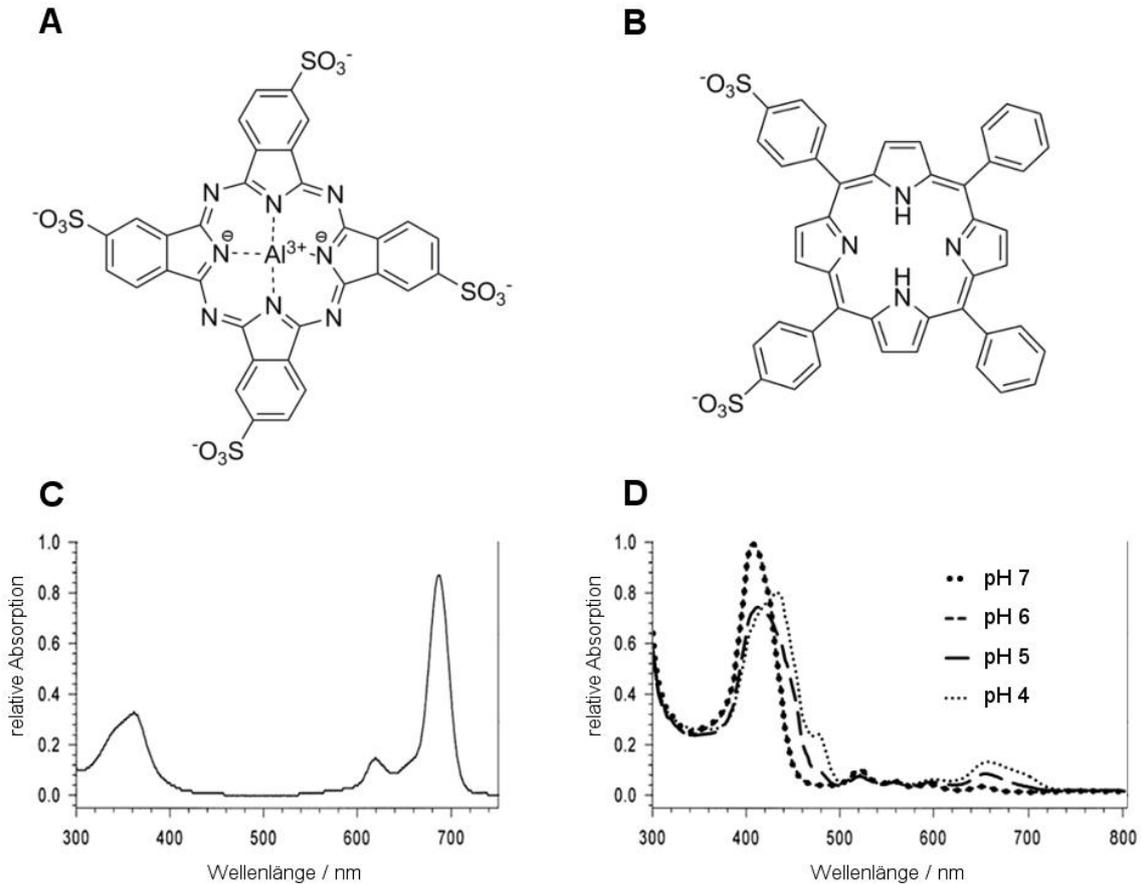
Als erster Ansatz zur Ermittlung der Sublokalisierung von AIR-3A in hIL-6R positiven Zellen wurden BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  Zellen nach Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Aptamers fixiert und immunhistochemisch das frühe Endosom der Zellen mittels eines Antikörpers gegen das frühe Endosom Antigen 1 (EEA1) gefärbt. In Abhängigkeit der Fixierungsmethode wurden unterschiedliche Co-Lokalisationsergebnisse erhalten (Abbildung 18). Während Zellen, die mit Methanol fixiert wurden (Abbildung 18A), kaum deckungsgleiche Fluoreszenzsignale von AIR-3A und EEA1 zeigten, konnte für Fixierungsmethoden mit Formaldehyd-Lösungen (Abbildung 18 B, hier erfolgte die Fixierung mit „Histofix“ von Carl Roth) Bereiche deckungsgleicher Fluoreszenz von AIR-3A und EEA1 ausgemacht werden.



**Abbildung 18: Co-Lokalisation von AIR-3A im frühem Endosom der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL-6R\_TNF $\alpha$ .** A) Für Zellen, die mit Methanol fixiert wurden, konnten kaum deckungsgleiche Fluoreszenzbereiche von AIR-3A und dem frühen Endosom Antigen 1 (EEA1) ermittelt werden. B) Für Zellen, die mit „Histofix“ (phosphatgepufferte Formaldehyd-Lösung) fixiert wurden, konnten teilweise deckungsgleiche Bereiche von AIR-3A und EEA1 gefunden werden.

### 5.1.3.2 Co-Lokalisation von AIR-3A im späten Endosom/Lysosom der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$

Die Co-Lokalisation von AIR-3A mit dem späten Endosom bzw. Lysosom in BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  Zellen wurde in unfixierten Zellen unter Verwendung spezifisch akkumulierender Fluoreszenzfarbstoffe analysiert. Als Fluoreszenzmarker wurden Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat (AIPcS<sub>4</sub>) und meso-Tetraphenylporphindisulfonat (TPPS<sub>2a</sub>) verwendet (Abbildung 19 A und B).

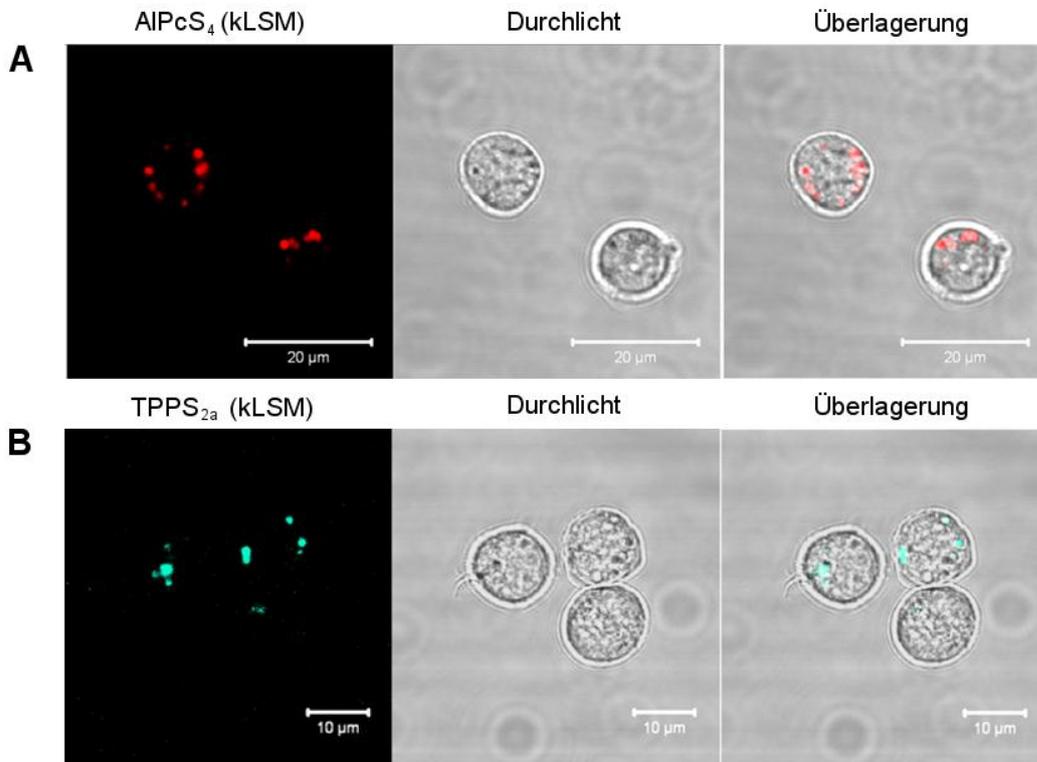


**Abbildung 19: Molekülstrukturen und Absorptionsspektren von AlPcS<sub>4</sub> und TPPS<sub>2a</sub>.** A) Struktur von Aluminiumphthalocyanintetrasulfonat (AlPcS<sub>4</sub>). B) Struktur von meso-Tetraphenylporphindisulfonat (TPPS<sub>2a</sub>). C) Das Absorptionsspektrum von AlPcS<sub>4</sub> zeigte keine pH-abhängigen Unterschiede im Bereich von pH 4-7. D) Das Absorptionsspektrum von TPPS<sub>2a</sub> zeigte eine pH-abhängige Verschiebung der Soret-Bande, wie sie von Cunderlikova *et al.* beschrieben wurde [254].  $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$  für pH > 5,  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$  für pH < 5.

AlPcS<sub>4</sub> [72] und TPPS<sub>2a</sub> [255] gehören zur Klasse der Photosensibilisatoren die zur photochemischen Internalisierung (PCI) verwendet werden können. Diese Stoffe reichern sich bedingt durch ihre Säure/Base-Eigenschaften in Membranen der Zellkompartimente mit leicht saurem pH-Wert an und besitzen zusätzlich die Eigenschaft nach photochemischer Anregung lokale Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu generieren. Ihre Fluoreszenzeigenschaften ( $\lambda_{\text{em}} > 700 \text{ nm}$ ) sowie nicht vorhandene Zytotoxizität bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen macht sie überdies zu geeigneten Markern für das späte Endosom und Lysosom. Abbildung 20 zeigt konfokale Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen mit der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ , welche für 30 h mit AlPcS<sub>4</sub> bzw. TPPS<sub>2a</sub> kultiviert wurden. AlPcS<sub>4</sub> konnte mittels Anregung über die Schulter des Absorptionsmaximums des Stoffes (Abbildung 19C) durch einen He/Ne-Lasers (633 nm) konfokal visualisiert werden (Abbildung 20A). Konfokale Mikroskopieaufnahmen von TPPS<sub>2a</sub> wurden unter Verwendung eines Ar-Lasers (458 nm) zur Anregung erstellt (Abbildung 20B). Im Fall von TPPS<sub>2a</sub> wirkt sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 413 nm zu 440 nm im Bereich von pH 5 (Abbildung 19D) zusätzlich förderlich für die exklusive Visualisierung des Lysosoms

## ERGEBNISSE

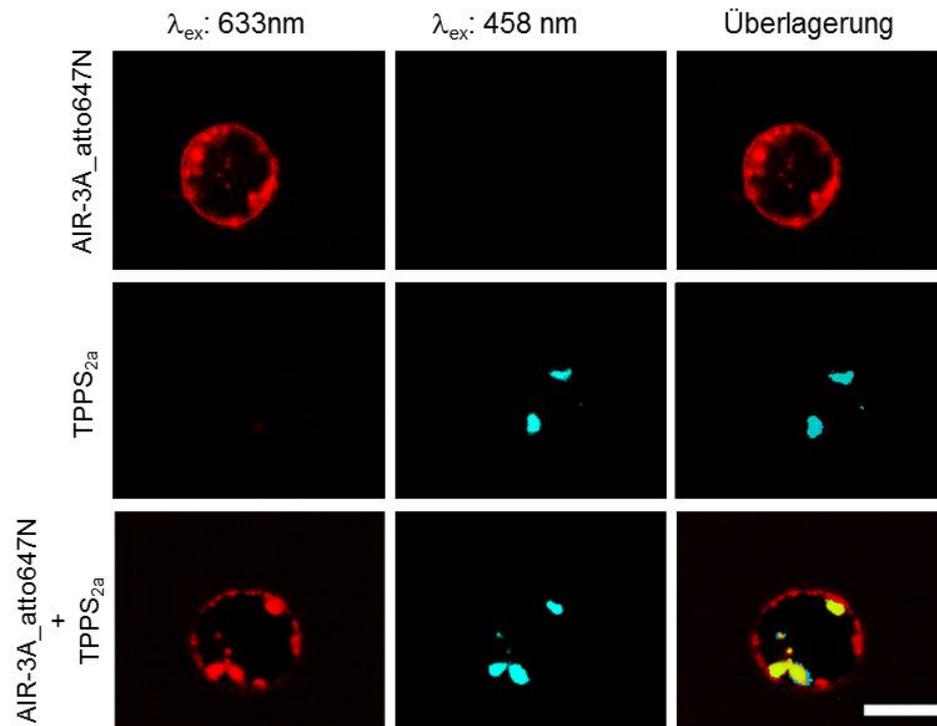
aus. Der Stoff verhält sich damit wie ein pH-Sensor, da bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 458 nm maßgeblich nur noch Bereiche mit  $\text{pH} \leq 5$  visualisiert werden.



**Abbildung 20: Subzelluläre Visualisierung der Fluoreszenzmarker AIPcS<sub>4</sub> und TPPS<sub>2a</sub> mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (kLSM).** BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  Zellen wurden für 30 h in Anwesenheit von A) 0,1  $\mu\text{g}$  AIPcS<sub>4</sub> /mL Medium bzw. B) 0,1  $\mu\text{g}$  TPPS<sub>2a</sub> /mL Medium kultiviert und nach einmaligem Waschen mikroskopisch untersucht.

Durch diese spektrochemischen Eigenschaften von TPPS<sub>2a</sub> konnten Co-Lokalisationsstudien von AIR-3A (fluoreszenzmarkiert mit Atto647N) und dem späten Endosom bzw. Lysosom erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 21). Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil des internalisierten Aptamers in das späte Endosom und Lysosom der Zellen prozessiert wurde. Um *cross-talk* (Fluoreszenzdetektion eines der beiden Fluorophore im Detektionskanal des anderen Fluorophors) auszuschließen, wurden jeweils Zellen untersucht, welche nur dem Marker TPPS<sub>2a</sub> bzw. nur der Inkubation zur Aufnahme von AIR-3A\_Atto647N ausgesetzt worden waren.

Eine ebenso eindeutige Co-Lokalisation mit AIPcS<sub>4</sub> konnte nicht durchgeführt werden, da die Fluoreszenz von AIPcS<sub>4</sub> nicht hinreichend von der Fluoreszenz der verwendeten Aptamer-Marker (Alexa Fluor 647 bzw. Atto647N) getrennt werden konnte



**Abbildung 21: Co-Lokalisation von AIR-3A mit TPPS<sub>2a</sub> mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (kLSM).** BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  Zellen wurden für 30 h in Anwesenheit 0,1  $\mu$ g TPPS<sub>2a</sub>/mL Medium kultiviert und anschließend in PBS für 15 min bei 37 °C mit AIR-3A\_Atto647N (50 nM) inkubiert (untere Reihe). Als Kontrolle wurden zum einen Zellen in Abwesenheit von TPPS<sub>2a</sub> kultiviert und analog mit AIR-3A\_Atto647N inkubiert (obere Reihe) und zum anderen in TPPS<sub>2a</sub> kultivierte Zellen ohne Inkubation mit AIR-3A\_Atto647N (mittlere Reihe) untersucht. Die Fluoreszenzdetektion von AIR-3A\_Atto647N erfolgte bei einer Anregung von  $\lambda_{ex}$  = 633 nm. Die Fluoreszenzdetektion von TPPS<sub>2a</sub> erfolgte bei einer Anregung von  $\lambda_{ex}$  = 458 nm. Detektion (beide Fluoreszenzfarbstoffe): LP 650 nm. Längenmaßstab: 10  $\mu$ m.

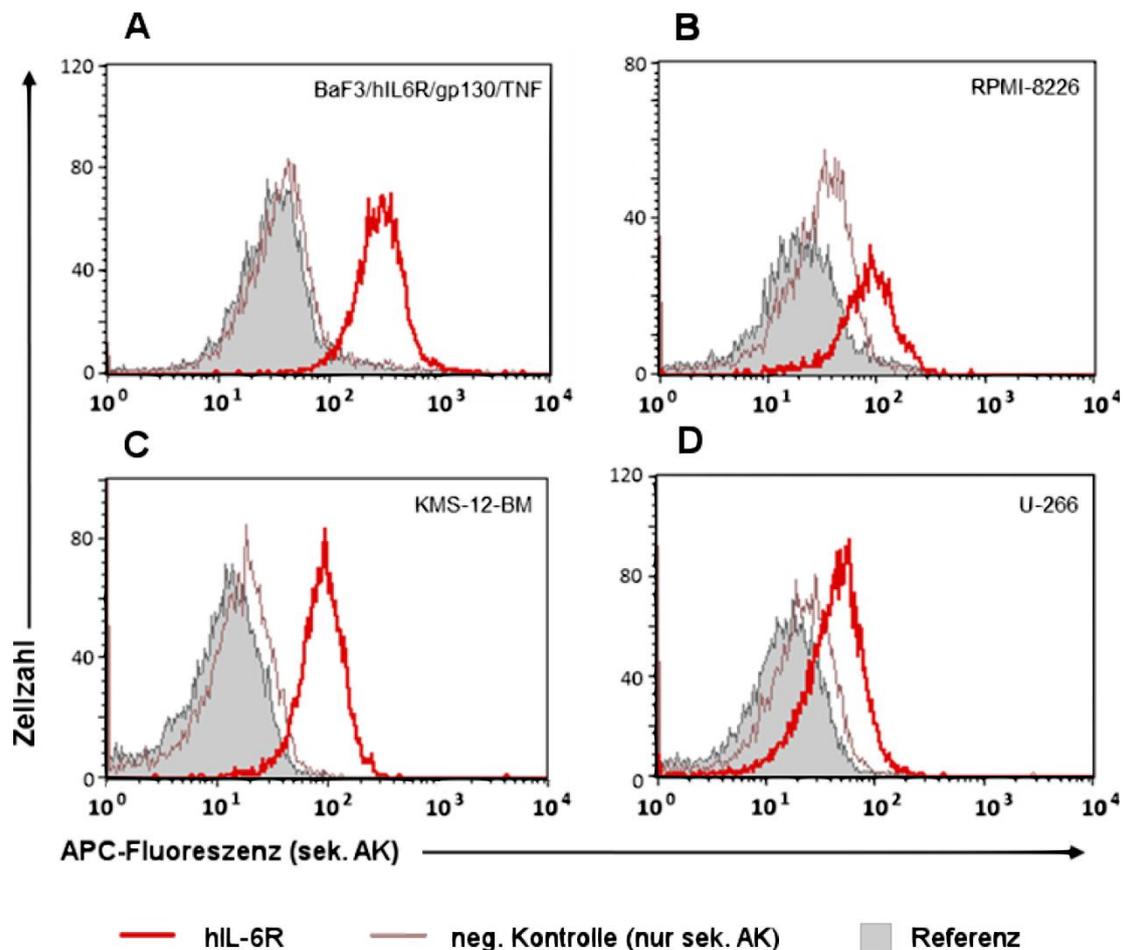
## 5.2 Analyse der Bindung von AIR-3A an humanen Zelllinien

### 5.2.1 Nachweis des hIL-6R auf humanen Zelllinien

Die Bindung und Internalisierung von AIR-3A wurde an humanen Zelllinien untersucht, welche hIL-6R nativ auf ihrer Oberfläche präsentieren. Hierfür wurden folgende humane Multiples Myelom (MM) Zelllinien ausgewählt:

1. RPMI-8226
2. KMS-12-BM
3. U-266

Zunächst wurde das Maß der hIL-6R-Expression durchflusszytometrisch analysiert und mit der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  verglichen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Nachweis des hIL-6R auf humanen MM-Zelllinien im Vergleich zur Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ .** Es wurden je 10<sup>5</sup> Zellen zuerst mit einem primären Antikörper gegen hIL-6R und anschließend mit einem APC-markierten sekundären Antikörper gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers für jeweils 30 min auf Eis inkubiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen wurden als negativ-Kontrolle Zellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. A) BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ . B) RPMI-8226. C) KMS-12-BM. D) U-266.

**Tabelle 16: Vergleich der hIL-6R-Moleküle auf der Zelloberfläche von durchflusszytometrisch analysierten Zelllinien.**

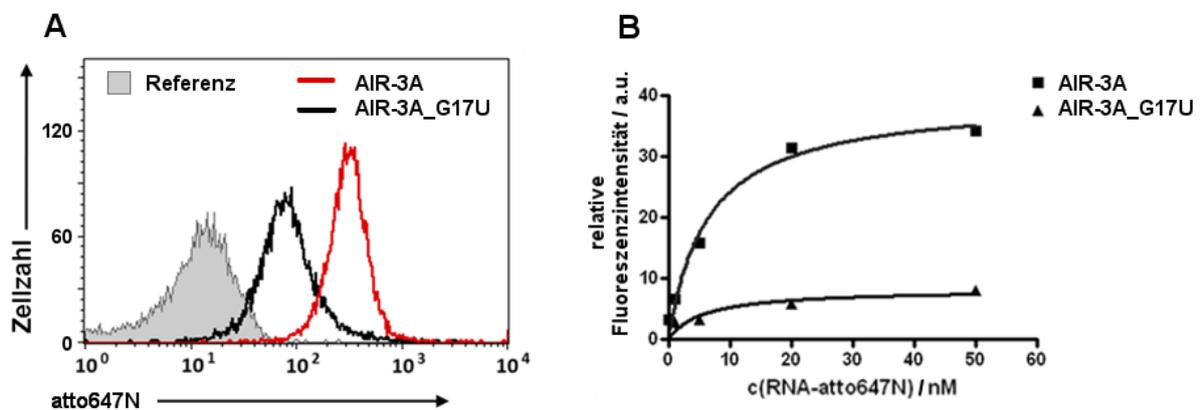
Zelllinie	hIL-6R-spezifische Fluoreszenzverschiebung
BaF3_hIL-6R_TNF $\alpha$	267,0
RPMI-8226	57,0
KMS-12-BM	75,6
U-266	21,9

Für die untersuchten Zelllinien wurde die Fluoreszenzverschiebung durch spezifische Antikörperbindung ermittelt (Fluoreszenzverschiebung bei Verwendung von primären und sekundären Antikörpern abzüglich der Fluoreszenzverschiebung durch den sekundären Antikörper, Tabelle 16). Alle drei MM-Zelllinien wiesen weniger hIL-6R-Moleküle auf der

Zelloberfläche auf als die Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ . Die Zelllinie KMS-12-BM wies von den untersuchten MM-Zelllinien die höchste Anzahl an hIL-6R-Molekülen auf. Aus den hIL-6R-spezifischen Fluoreszenzwerten der Zelllinien (BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ : 267,0; KMS-12BM: 75,6) kann abgeleitet werden, dass die Anzahl der auf der Oberfläche präsentierten hIL-6R-Moleküle für die Zelllinie KMS-12-BM etwa viermal kleiner ist als für BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  Zellen.

### 5.2.2 Bindung von AIR-3A an die humane MM-Zelllinie KMS-12-BM

Von den in Abschnitt 5.2.1 untersuchten humanen MM-Zelllinien zeigte lediglich KMS-12-BM eine spezifische Bindung von AIR-3A (Abbildung 23A). Die Zelllinien RPMI-8226 und U-226 zeigten annähernd gleichstarke Bindung für AIR-3A und die Negativkontrolle AIR-3A\_G17U und wurden daher nicht näher charakterisiert (Daten nicht gezeigt). KMS-12-BM Zellen zeigten ebenfalls eine Bindung der Negativkontrolle AIR-3A\_G17U, allerdings mit deutlich geringerem Anteil gebundener RNA. Für AIR-3A als auch AIR-3A\_G17U wurde die Konzentrationsabhängigkeit gebundener RNA aus Titrationsreihen ermittelt (Abbildung 23B) und die jeweiligen Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) sowie relative Anzahl gebundener RNA-Moleküle ( $B_{max}$ ) bestimmt (Tabelle 17).



**Abbildung 23: Bindung von AIR-3A an Zellen der MM-Zelllinie KMS-12-BM.** A) Es wurden je  $10^5$  Zellen in PBS für 45 min bei 37 °C mit Atto647N-markierter RNA inkubiert und nach anschließendem Waschen durchflusszytometrisch analysiert. B) KMS-12-BM Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Atto647N-markierter RNA für 2 min bei 37 °C inkubiert und nach anschließendem Waschen durchflusszytometrisch analysiert.

**Tabelle 17: Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) und relative Anteile gebundener RNA-Moleküle ( $B_{max}$ ).**

RNA	$K_d$ /nM	$B_{max}$ (rel. Fluoreszenz)
AIR-3A	6,44	39,6
AIR-3A_G17U	5,82	8,27

### 5.3 AIR-3A vermittelte *in vitro*-PDT

Das Aptamer AIR-3A wurde als Träger des für die photodynamische Therapie verwendeten Photosensibilisators Chlorin e6 verwendet. Hierfür wurde Chlorin e6 kovalent an AIR-3A gebunden und die Aufnahme sowie die photoinduzierte Zytotoxizität in der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  analysiert.

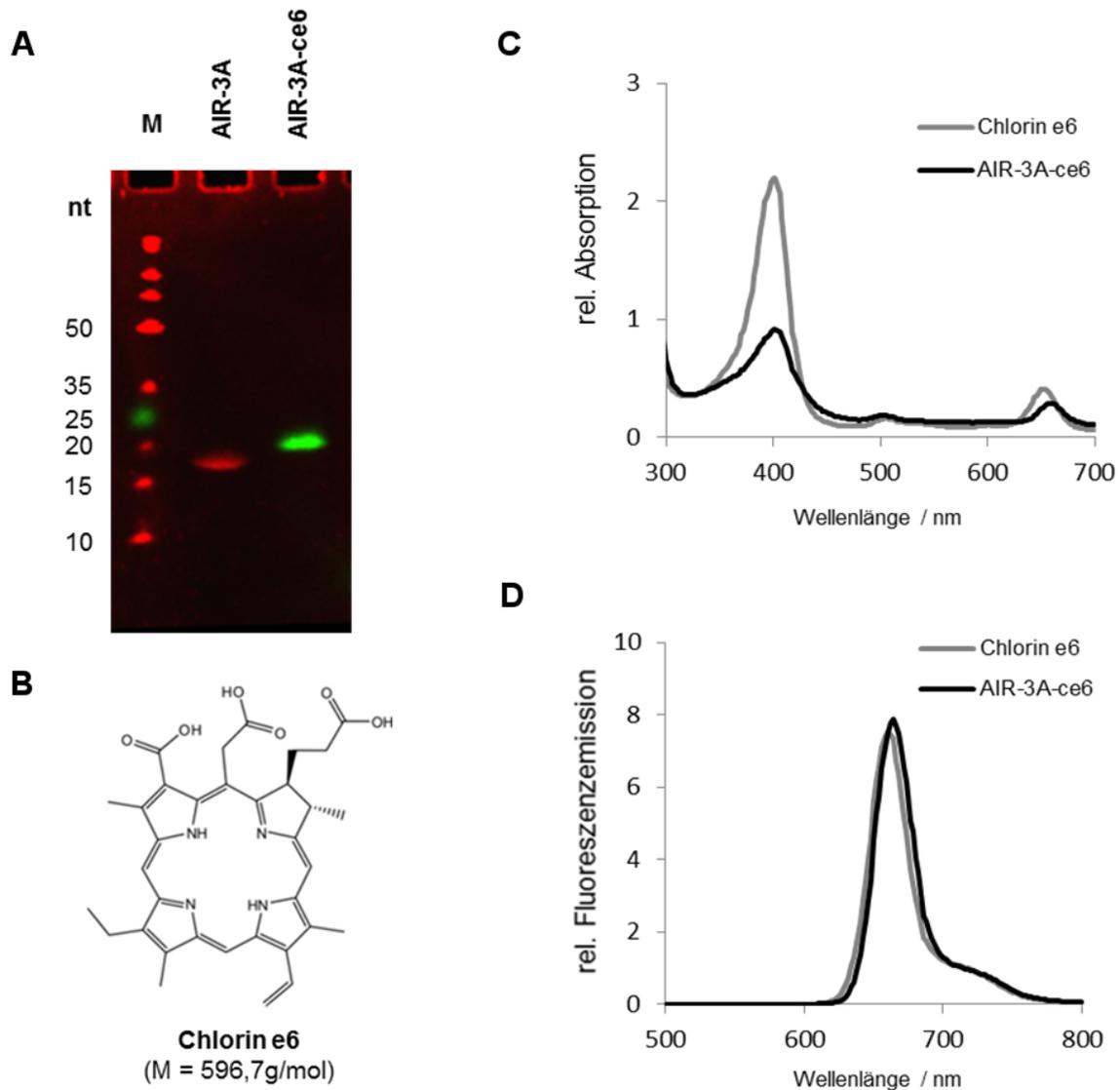
#### 5.3.1 Konjugation von AIR-3A und Chlorin e6

Die Konjugation von Chlorin e6 mit dem RNA-Aptamer AIR-3A erfolgte über die Bildung einer Amid-Bindung zwischen der 3'-Amino-Modifikation der RNA und einer der drei Carbonsäuregruppen von Chlorin e6. Nach Reinigung des Konjugates mittels Ethanolpräzipitation aus sauer gepufferter Lösung (Abschnitt 4.2.3) wurde das mono-Chlorin e6 modifizierte Aptamer AIR-3A-ce6 erhalten. Die anschließende gelektrophoretische Analyse des Produktes lieferte eine singuläre Bande mit der Fluoreszenzeigenschaft von Chlorin e6 (verwendete Detektion: ex. = 635 nm, em. > 650 nm). Das Produkt besaß im Vergleich zur Edukt-RNA eine leicht geringere elektrophoretische Mobilität, mit einer Differenz von ca. zwei Nukleotiden (Abbildung 24A). Diese Differenz entspricht der zusätzlichen Masse von Chlorin e6 (M = 596,7 g/mol; Abbildung 24B).

Die Ausbeute des Konjugats wurde photometrisch anhand der Soret-Bande von Chlorin e6 (400 nm) bestimmt und betrug zwischen 60% und 72%. In Abbildung 24C und D sind die Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren des freien Chlorin e6 und des Konjugats AIR-3A-ce6 wiedergegeben. Die spektroskopischen Eigenschaften von chlorin e6 werden durch die Konjugation mit AIR-3A nur geringfügig beeinflusst. Sowohl für die Absorptionsmaxima als auch für das Fluoreszenzmaximum wurde eine geringfügige bathochrome Verschiebung für das Konjugat beobachtet (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaxima von Chlorin e6 und AIR-3A-ce6.**

	<b>Absorptionsmaxima</b>	<b>Fluoreszenzemissionsmaximum</b>
	(Soret-Bande ; Q-Bande)	
freies chlorin e6	400 $\pm$ 2 nm ; 652 $\pm$ 3 nm	660 $\pm$ 2 nm
AIR-3A-ce6	402 $\pm$ 1 nm ; 658 $\pm$ 2 nm	664 $\pm$ 2 nm



**Abbildung 24: Analysen von AIR-3A-ce6.** A) Gelelektrophoretische Analyse von AIR-3A und AIR-3A-ce6 (15% PAA-Gel, 8 M Harnstoff). M: Marker, DNA Ultra-Low-Range-Ladder. Detektion: Ethidiumbromid (rot), Fluoreszenz BP 695 nm (grün, Chlorin e6). B) Struktur von Chlorin e6. C) Absorptionsspektrum von Chlorin e6 und AIR-3A-ce6. D) Fluoreszenzspektrum von Chlorin e6 und AIR-3A-ce6 (Anregung bei 400 nm).

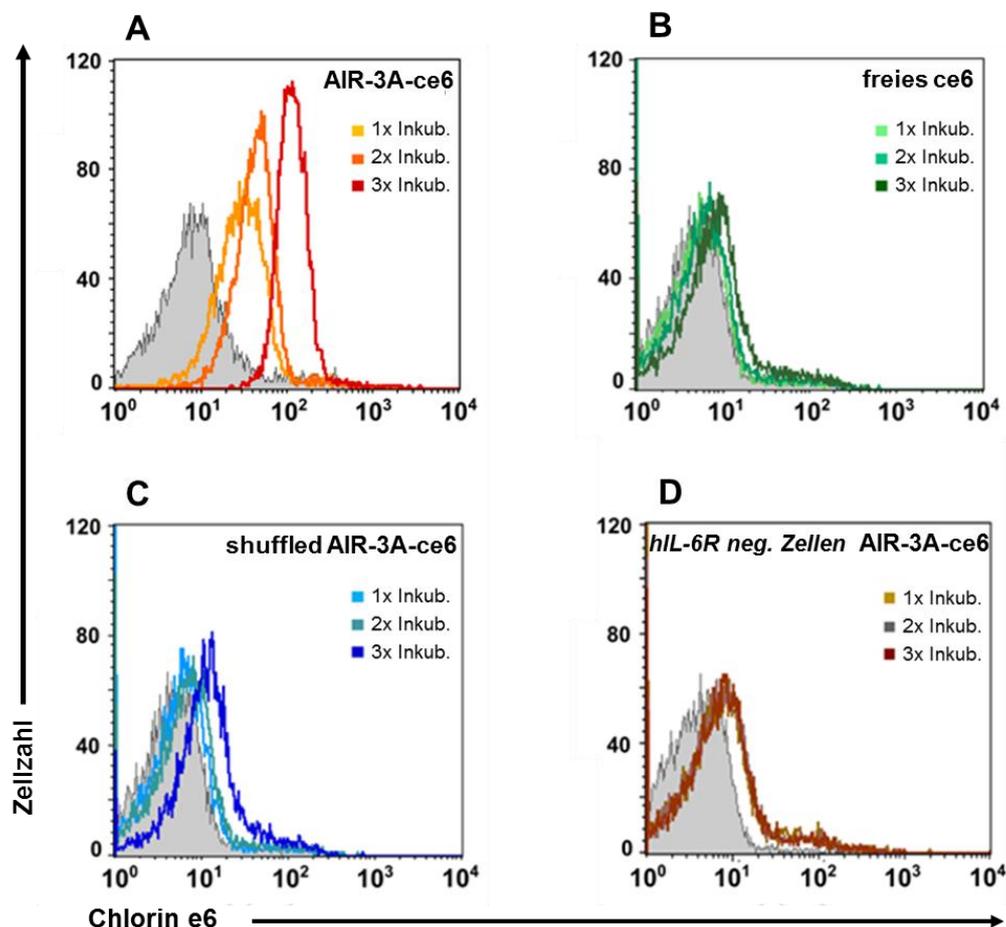
### 5.3.2 Bindungsanalyse von AIR-3A-ce6 an hIL6R-präsentierende Zellen

Um zu überprüfen, ob das Aptamer nach Konjugation mit Chlorin e6 noch an hIL-6R bindet, wurden BaF3\_gp130\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  Zellen in PBS mit dem Konjugat AIR-3A-ce6 (50 nM) für 45 min bei 37 °C inkubiert. In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse zeigten diese Zellen eine deutliche Zunahme an der für Chlorin e6 charakteristischen roten Fluoreszenz (Abbildung 25A). Als Kontrollen wurde die gleiche Zelllinie mit äquivalenten Mengen freiem Chlorin e6 bzw. dem Chlorin e6-Konjugat der nicht an hIL-6R bindenden RNA *shuffled* AIR-3A (*shuffled* AIR-3A-ce6) inkubiert und analysiert (Abbildung 25B und Abbildung 25C). In diesem Fall wurde keine Zunahme an roter Fluoreszenz gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt. Ebenso wurde keine signifikante Fluoreszenzzunahme für

## ERGEBNISSE

hIL-6R negative BaF3-Zellen festgestellt, wenn diese analog mit 50 nM AIR-3A-ce6 inkubiert wurden (Abbildung 25D).

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass das Maß, AIR-3A spezifisch zu binden und zu internalisieren, mit der Regeneration von hIL-6R-Einheiten auf der Zelloberfläche zunimmt (Abschnitt 5.1.2). Es wurde daher ermittelt, ob Chlorin e6 in den Zellen durch wiederholtes Inkubieren mit AIR-3A-ce6 angereichert werden kann. Ein Teil der Zellen wurde dafür nach der oben beschriebenen Behandlung für 5 Stunden in serumhaltigem DMEM (inkl. hIL-6) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert (Rezeptorregeneration) und anschließend erneut für 45 min mit 50 nM AIR-3A-ce6 bei 37 °C inkubiert. Die Analyse dieser Zellen (Abbildung 25A, 2x Inkub.) ergab eine zusätzliche Zunahme an roter Fluoreszenz. Die entsprechenden Kontrollen (Abbildung 25B-D, 2x Inkub.) wiesen auch hierbei keine Fluoreszenzzunahme auf.



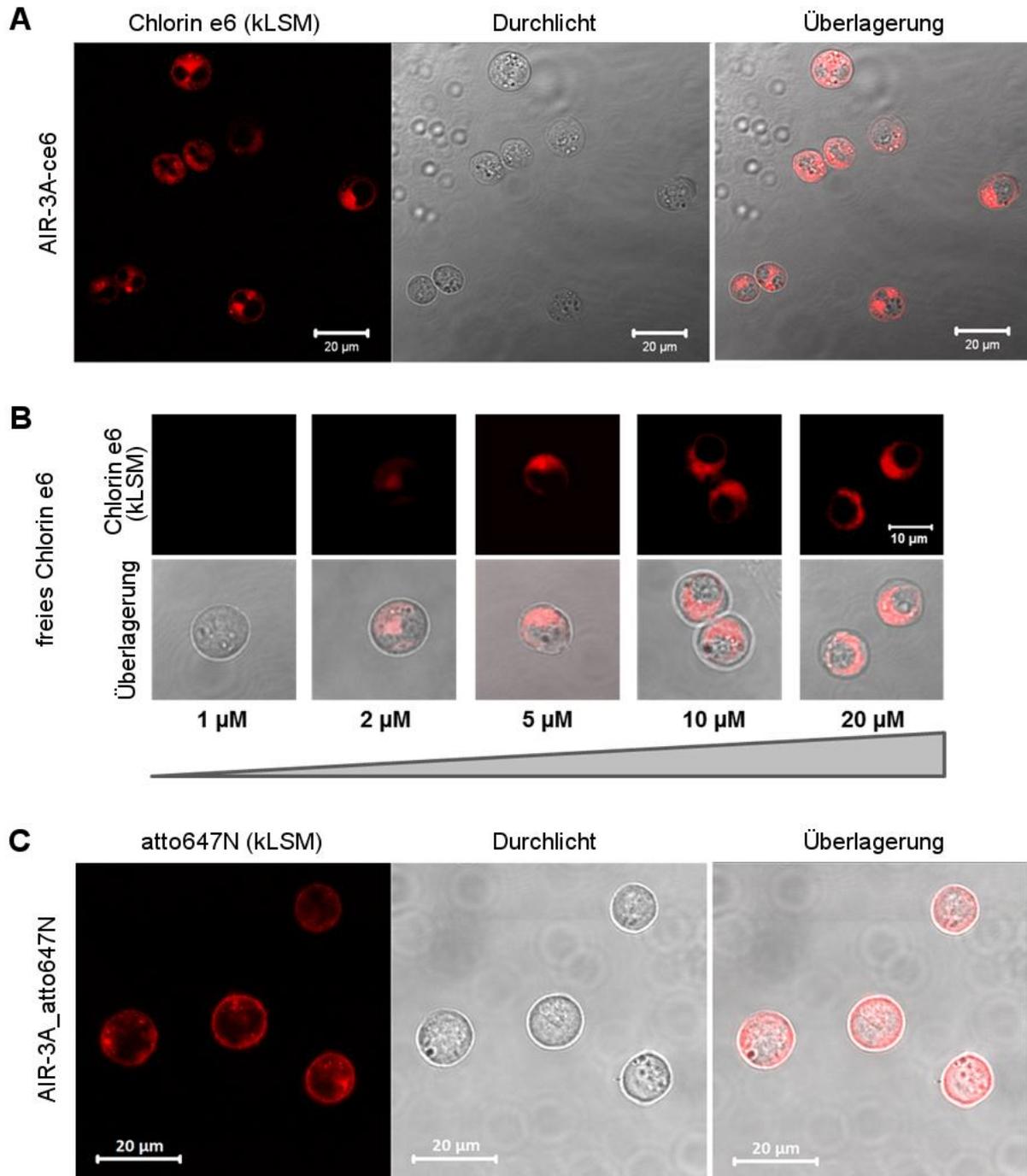
**Abbildung 25: Bindung von AIR-3A-ce6 an BaF3-Zellen.** Es wurden je 10<sup>6</sup> Zellen in serumfreiem Medium mit RNA-Konjugaten von Chlorin e6 oder freiem Chlorin e6 (je 50 nM) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurde ein Teil der Zellen durchflusszytometrisch analysiert (1x Inkub.) und ein weiterer Teil je einmal (2x Inkub.) bzw. zweimal (3x Inkub.) für 5 h in serumhaltigem Medium kultiviert, daraufhin erneut in gleicher Weise mit RNA-Konjugaten von Chlorin e6 oder freiem Chlorin e6 kultiviert, gewaschen und durchflusszytometrisch untersucht. Grau ausgefüllte Histogramme repräsentieren Referenzzellen ohne Behandlung. A) hIL-6R positive BaF3 Zellen mit dem Konjugat AIR-3A-ce6. B) hIL-6R positive Zellen mit freiem Chlorin e6. C) hIL-6R positive Zellen mit der Negativkontrolle shuffled AIR-3A-ce6. D) hIL-6R negative BaF3 Zellen mit AIR-3A-ce6. Alle Experimente wurden unter weitestgehend abgedunkelten Bedingungen durchgeführt.

Schließlich wurden die Zellen nach erneuter Regenerationsphase (5 Stunden kultivieren in serumhaltigem DMEM, inkl. hIL-6, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>) einer dritten Inkubation mit AIR-3A-ce6 unterzogen. Hierdurch konnte die rote Fluoreszenzintensität der Zellen nochmals verstärkt werden (Abbildung 25A, 3x Inkub.). In den Kontrollexperimenten führte diese dritte Inkubationsphase zu einer geringfügigen Fluoreszenzverstärkung bei Zellen, die mit freiem Chlorin e6 (Abbildung 25B 3x Inkub.) oder *shuffled* AIR-3A-ce6 inkubiert wurden (Abbildung 25C, 3x Inkub.). Bei BaF3-Zellen, die hIL-6R nicht präsentierten (hIL-6R neg. Zellen), wurde auch nach drei Inkubationen mit AIR-3A-ce6 keine Fluoreszenzverstärkung festgestellt (Abbildung 25D, 3x Inkub.).

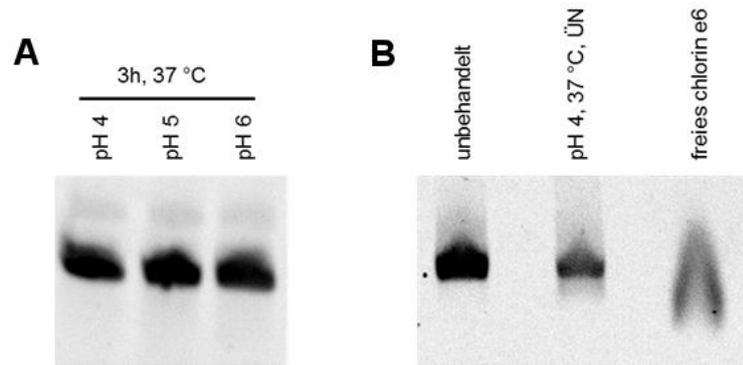
### 5.3.3 Analyse der Aufnahme von AIR-3A-ce6 in hIL6R-präsentierende Zellen

Die aus den durchflusszytometrischen Analysen (Abschnitt 5.3.2) gewonnene Kenntnis über die Anreicherung von Chlorin e6 in hIL-6R positiven BaF3-Zellen wurde zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte Chlorin e6 im Cytosol von hIL-6R positiven Zellen nach Inkubation mit 50 nM AIR-3A-ce6 lokalisiert werden (Abbildung 26A). Die Aufnahme von freiem Chlorin e6 hingegen konnte erst ab einer Konzentration von 2 µM unter gleichen Mikroskopeinstellungen beobachtet werden. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen (45 min, 37 °C, Inkubation in PBS) wurde im Bereich von 5-10 µM eine Sättigung an aufgenommenem freiem Chlorin e6 erreicht (Abbildung 26B).

Die Verteilung des Fluoreszenzsignals von Chlorin e6, welches durch AIR-3A in die Zelle aufgenommen wurde, zeigte deutliche Unterschiede zu der Verteilung der Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes Atto647N, welcher ebenfalls an AIR-3A gekoppelt in die Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 26C). Für Chlorin e6 zeigte die Fluoreszenzdetektion eine weite Verteilung über das gesamte Cytosol. Der Zellkern schien hingegen nicht zugänglich für Chlorin e6. Im Gegensatz dazu konnte Atto647N nicht über das gesamte Cytosol detektiert werden, sondern lediglich in vesikelartigen Bereichen (Vgl. Abschnitt 5.1.3).



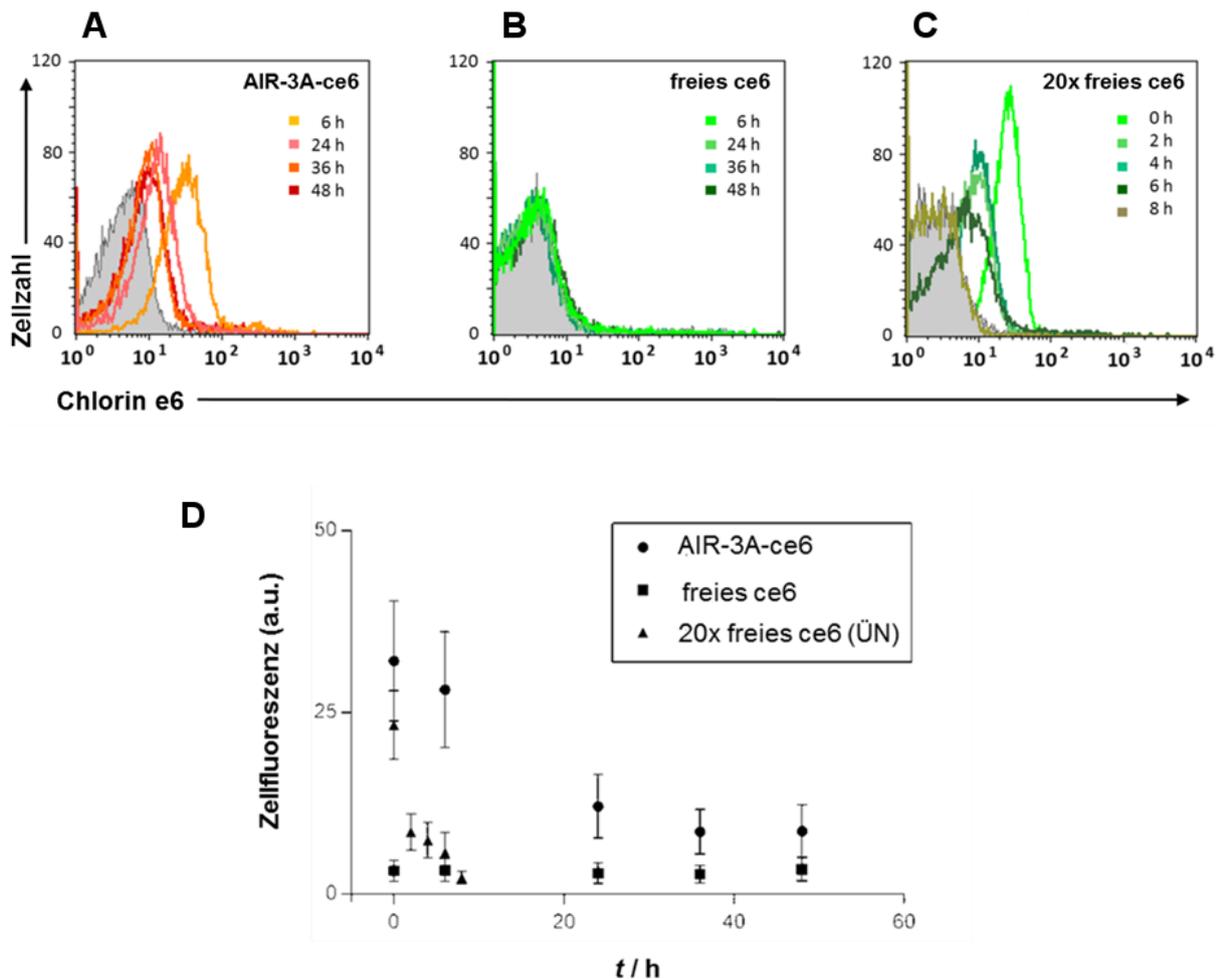
**Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von AIR-3A-ce6 in hIL-6R positiven BaF3-Zellen.** A) Zellen, die in serumfreiem Medium für 45 min bei 37 °C mit AIR-3A-ce6 (50 nM) inkubiert wurden, zeigten eine Verteilung der Fluoreszenz von Chlorin e6 über das gesamte Cytosol der Zelle. B) Für Zellen die in gleicher Weise mit freiem Chlorin e6 inkubiert wurden, konnten erst ab einer Konzentration von 2 µM Chlorin e6 Fluoreszenzsignale innerhalb der Zelle detektiert werden. C) Im Vergleich zu AIR-3A-ce6 wurde die Fluoreszenz von Atto647N-markiertem AIR-3A nicht über das gesamte Cytosol der Zellen detektiert, sondern in vesikelartigen Bereichen. Dargestellt sind die konfokale Visualisierung von Chlorin e6 bzw. Atto647N (kLSM, in Rot), Durchlichtaufnahmen und die Überlagerung beider Kanäle.



**Abbildung 27: Stabilität von AIR-3A-ce6 unter sauren Bedingungen.** Dargestellt sind die Banden von AIR-3A-ce6 bzw. freiem Chlorin e6 in einem 15%igen PAA-Gel (8 M Harnstoff) im Detektionskanal der Fluoreszenz von Chlorin e6 (BP 695 nm).

Es wurde zudem untersucht, ob die intrazelluläre Freisetzung von Chlorin e6 aus endozytiertem AIR-3A-ce6 auf sauer katalysierter Abspaltung von Chlorin e6 (im späten Endosom bzw. Lysosom) beruht. Hierfür wurden Aliquots von AIR-3A-ce6 unter sauren Pufferbedingungen bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 27). Weder nach Inkubationszeiten, die denen aus den vorherigen Zellversuchen entsprachen (Abbildung 27A), noch nach Inkubation über Nacht (Abbildung 27B) konnten nennenswerte Mengen an von der RNA abgespaltenem Chlorin e6 ermittelt werden.

Im Weiteren wurde untersucht, inwiefern das mittels Aptamer aufgenommene Chlorin e6 von den Zellen gespeichert werden kann. Hierfür wurde die Abgabe von aufgenommenem Chlorin e6 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Aufnahme des Photosensibilisators wurden zunächst Zellen einerseits mit dem Konjugat AIR-3A-ce6 und andererseits mit freiem Chlorin e6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium ohne AIR-3A-ce6 bzw. freiem Chlorin e6 kultiviert und die Fluoreszenzintensität der Zellen analysiert. Aus den Analysen (Abbildung 28) konnte ermittelt werden, dass Zellen, die Chlorin e6 als Aptamer-Konjugat aufgenommen hatten, einen deutlich geringeren Rückgang an roter Fluoreszenz zeigten als Zellen, die Chlorin e6 in freier Form aufgenommen hatten. Der Rückgang an roter Fluoreszenz entsprach für die für 45 min mit 50 nM AIR-3A-ce6 inkubierten Zellen einer exponentiellen Abnahme mit einer Halbwertszeit von ca. 16 h. Nach 48 h konnte noch immer eine leicht höhere Fluoreszenzintensität gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 28A und D). Zellen, welche für 45 min mit 50 nM freiem Chlorin e6 inkubiert wurden, zeigten keine Aufnahme des Photosensibilisators (Abbildung 28B). Daher wurde die Konzentration an freiem Chlorin e6 auf eine zwanzigfache Konzentration (1 µM) erhöht und die Inkubationszeit auf 12 h verlängert (Abbildung 28C). Danach erfolgte der Rückgang der roten Fluoreszenz dieser Zellen deutlich schneller (Halbwertszeit < 2h) als bei den Zellen, die durch das Aptamer vermittelt Chlorin e6 aufgenommen hatten.



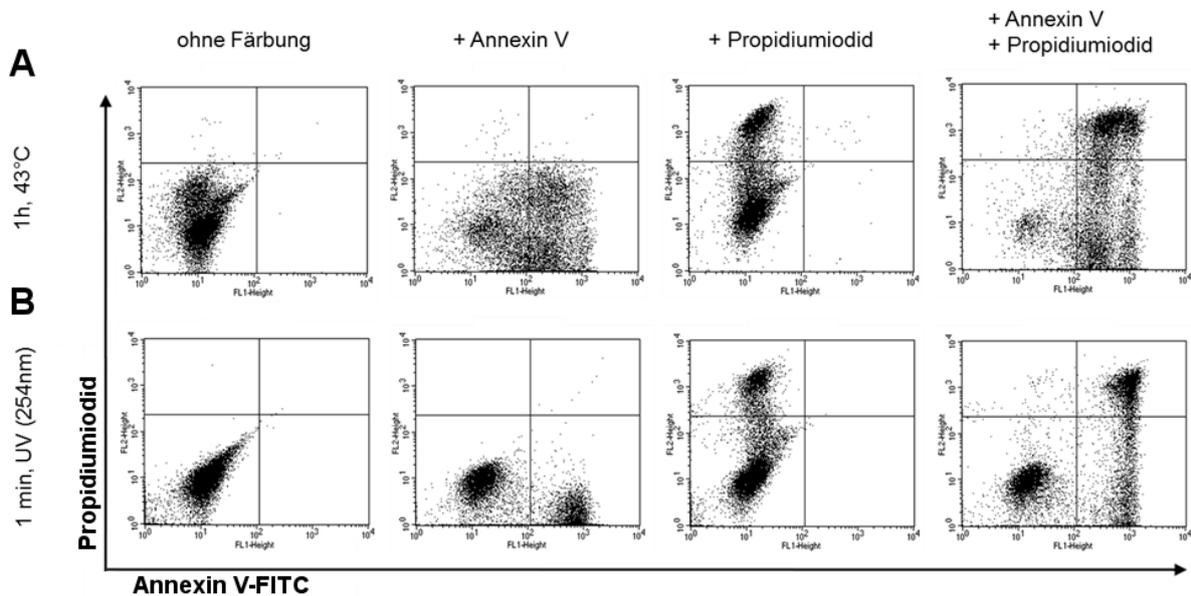
**Abbildung 28: Verbleib von Chlorin e6 in hIL-6R positive BaF3-Zellen.** A) Durchflusszytomitrische Analyse von hIL-6R positiven BaF3-Zellen nach Inkubation mit AIR-3A-ce6 (50 nM) für 45 min bei 37 °C in serumfreiem Medium und anschließendem Reaktivieren in wirkstofffreiem serumhaltigen Medium. B) Analog zu (A) wurden Zellen mit 50 nM freiem Chlorin e6 inkubiert. C) Zellen wurden mit 1 µM freiem Chlorin e6 über Nacht inkubiert und anschließend in wirkstofffreiem serumhaltigen Medium reaktiviert. D) Graphische Auftragung aus Doppelbestimmungen der Experimente A-C. Alle Experimente wurden unter weitestgehend abgedunkelten Bedingungen durchgeführt.

### 5.3.4 AIR-3A-ce6 vermittelte Zytotoxizität in BaF3-Zellen (Aptamer vermittelte PDT)

Die Aptamer vermittelte PDT wurde *in vitro* an BaF3-Zellen durchgeführt, die zuvor Chlorin e6 in Form von AIR-3A-ce6 aufgenommenen hatten. Die Analyse vitaler, früh-apoptotischer sowie spät-apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen erfolgte mittels Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid. Die Auszählung der gefärbten Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Zur Ermittlung der idealen Konzentrationen an Annexin V und Propidiumiodid (PI) sowie der korrekten Kanalverstärkungen und Kompensationen des Durchflusszytometers, wurde zunächst gezielt Apoptose in BaF3-Zellen durch Inkubation für 1 h bei 43 °C (Abbildung 29A) oder UV-Bestrahlung für 1 min (254 nm, 4W) eingeleitet (Abbildung 29B). Vitale Zellen wurden in den erhaltenen Zweikanalauftragungen als Ereignisse im unteren linken Quadrant erhalten. Früh-apoptotische Zellen reagierten positiv

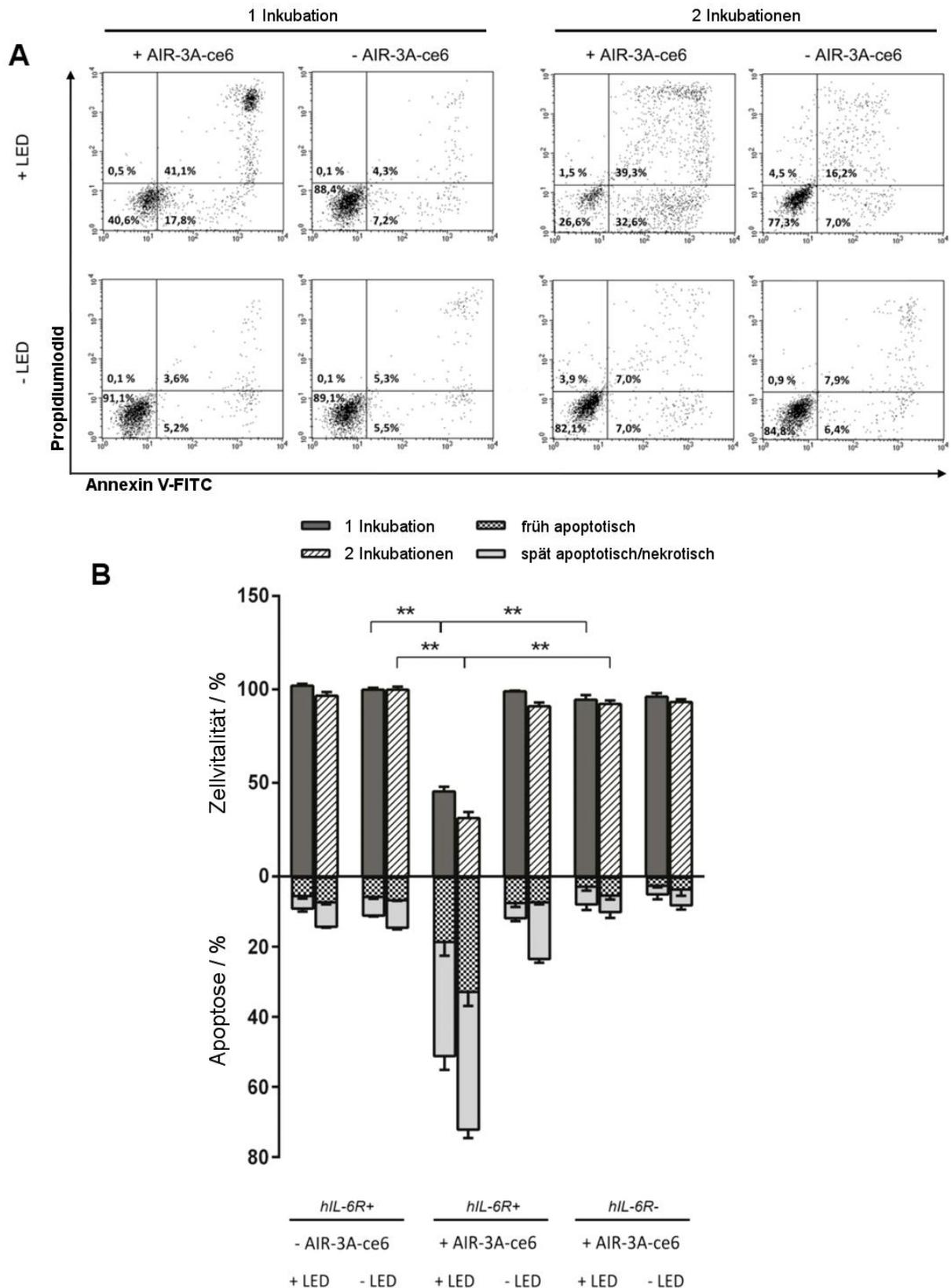
## ERGEBNISSE

auf die Annexin V-Färbung (rechter unterer Quadrant), spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen reagierten sowohl positiv auf die Annexin V-Färbung als auch die PI-Färbung (rechter oberer Quadrant, Annexin V- und PI-Färbung vorausgesetzt; linker oberer Quadrant wenn nur PI-Färbung vorgenommen wurde).



**Abbildung 29: Positivkontrollen zur durchflusszytometrischen Apoptosebestimmung.** Zur Etablierung des durchflusszytometrischen Apoptosenachweises wurden hIL-6R positive BaF3-Zellen für 1 h bei 43 °C kultiviert (A) bzw. 1 min einer UV-Bestrahlung (4W, 254 nm) ausgesetzt und anschließend für 1 h bei 37 °C kultiviert (B). Unter der gegebenen Färbemethode (Annexin V bzw. Propidiumiodid) erschienen doppelt negativ gefärbte Zellen im linken unteren Quadranten, Propidiumiodid positive Zellen in den oberen Quadranten, Annexin V positive Zellen in den rechten Quadranten, sowie doppelt positiv gefärbte Zellen im rechten oberen Quadranten.

Die Aptamer vermittelte PDT wurde *in vitro* an BaF3-Zellen durchgeführt, die zuvor Chlorin e6 in Form von AIR-3A-ce6 aufgenommenen hatten (Inkubation: 45 min, 37 °C in serumfreien DMEM in Anwesenheit von 50 nM AIR-3A-ce6). Zur Aktivierung des aufgenommenen Photosensibilisators wurden die Zellen mittels LED (660 nm; 100 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Wie Abbildung 30 zu entnehmen ist, wurde bei Zellen, die alle Voraussetzungen für die Aptamer vermittelte PDT aufwiesen (Präsentieren von hIL-6R, Inkubation mit AIR-3A-ce6, LED-Bestrahlung) ein signifikanter Rückgang der Zellvitalität auf  $45,6 \pm 1,8\%$  beobachtet. Über die oben beschriebene Doppelfärbung konnten durchflusszytometrisch ebenso signifikant mehr früh-apoptotische ( $17,8 \pm 2,3\%$ ) bzw. spät-apoptotische/nekrotische Zellen ( $41,1 \pm 1,2\%$ ) für diese Versuchsbedingungen gegenüber allen Kontrollen ermittelt werden. Als Kontrollen wurden in der Versuchsdurchführung jeweils eine bzw. zwei der genannten Voraussetzungen weggelassen.

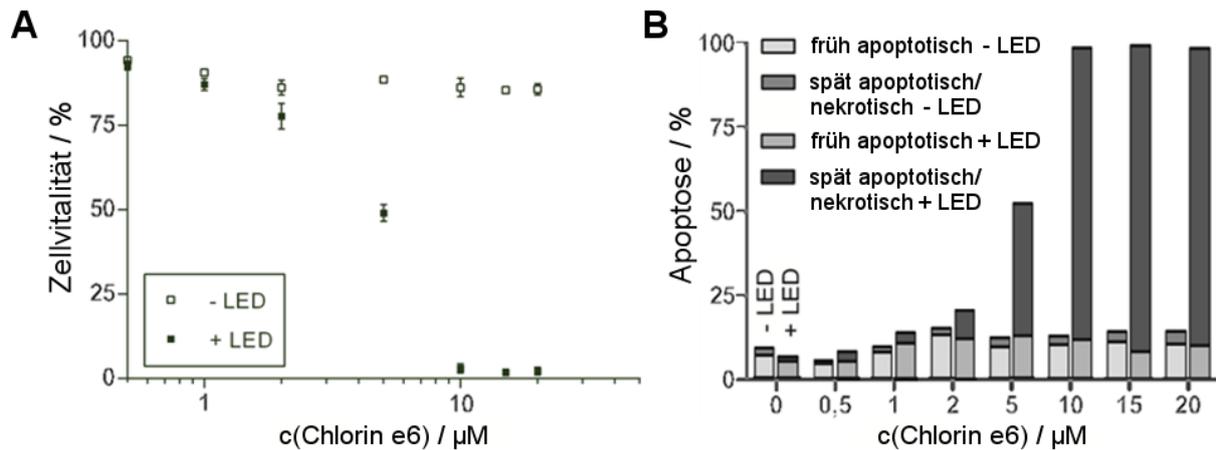


**Abbildung 30: Vitalitätsanalyse von hIL-6R positiven BaF3-Zellen nach Behandlung mit AIR-3A-ce6.** A) Durchflusszytometrische Primärdaten der durchgeführten aptamervermittelten PDT mit AIR-3A. Die Zellen wurden nach Inkubation mit 50 nM AIR-3A-ce6 entweder mit Licht bestrahlt (+LED; 660 nm, 100 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW/cm<sup>2</sup>) oder im Dunklen kultiviert (-LED) und anschließend mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC gefärbt. B) Graphische Darstellung der ermittelten Vitalitätswerte und Anteile apoptotischer Zellen. Werte mit statistisch signifikanten Unterschieden sind mit \*\* (P<0,01) gekennzeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen zweier unabhängiger Experimente (n=4) mit den zugehörigen Standardabweichungen.

Zudem wurden analoge Versuchsreihen durchgeführt, in denen die Zellen wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben wiederholt mit AIR-3A-ce6 inkubiert wurden. Für diese Zellen wurde, wiederum bei Erfüllen aller Voraussetzungen für die aptamervermittelte PDT, ein größerer Rückgang der Zellvitalität ( $31,4 \pm 2,3\%$ ) und Anstieg an apoptotischen Zellen (früh-apoptotisch:  $32,6 \pm 2,8\%$ ; spät-apoptotisch/nekrotisch:  $39,3 \pm 1,7\%$ ) gegenüber einfach inkubierten Zellen beobachtet. Die Kontrollen zeigten keine signifikante Veränderung in der Zellvitalität und den Anteilen an apoptotischen Zellen, mit Ausnahme der Zellen, welche zweifach mit AIR-3A-ce6 inkubiert, aber nicht der LED-Bestrahlung ausgesetzt wurden. Für diese Zellen wurde ebenfalls ein leichter Rückgang der Zellvitalität ( $91,2 \pm 2,1\%$ ) beobachtet, mit leichtem Anstieg an spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen (auf  $10,9 \pm 1,5\%$ ).

### 5.3.5 Zytotoxizität von freiem Chlorin e6

Im Vergleich zur Zytotoxizität durch AIR-3A-ce6 wurde die Zytotoxizität durch freies Chlorin e6 anhand einer Konzentrationsreihe bestimmt. Um Sättigung der Aufnahme zu gewährleisten, wurden die Zellen hierbei über Nacht mit Chlorin e6 inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Strahldichte (Energie der LED-Bestrahlung,  $30 \text{ mW/cm}^2$ , 660 nm) gewählt wie in der Versuchsdurchführung mit AIR-3A-ce6 (Abschnitt 5.3.4). Die im Anschluss durchgeführte durchflusszytometrische Analyse lieferte einen exponentiellen Zusammenhang zwischen der Abnahme der Zellvitalität und der verwendeten Konzentration von freiem Chlorin e6 (Abbildung 31A; hier sigmoidaler Kurvenverlauf wegen logarithmierter Abszisse). Die Abnahme der Zellvitalität auf 50% erfolgte bei einer Konzentration von ca.  $5 \mu\text{M}$ . Für Zellen, die nach Inkubation mit freiem Chlorin e6 nicht bestrahlt wurden, wurde keine wesentliche Abnahme der Zellvitalität ermittelt. Die maximale Abnahme an Zellvitalität für diese Zellen betrug 12%. Des Weiteren wurde der Anteil früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen analysiert (Abbildung 31B). Für Zellen, die LED-Bestrahlung erhielten wurde ein exponentieller Anstieg spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen mit ansteigender Konzentration an Chlorin e6 registriert. Dieser Anstieg korrelierte mit der Abnahme an Zellvitalität. Der Anteil früh-apoptotischer Zellen hingegen erhöhte sich nur geringfügig mit steigender Chlorin e6-Konzentration (maximal 7%). Für Zellen, die keine LED-Bestrahlung erhielten wurde ein geringer Anstieg der Fraktion früh-apoptotischer Zellen ermittelt. Der Anteil spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen lag bei diesen Zellen unabhängig von der verwendeten Chlorin e6-Konzentration bei ca. 2%.



**Abbildung 31: Zytotoxizität durch freies Chlorin e6.** BaF3 Zellen wurden über Nacht mit Chlorin e6 (0-20 µM) inkubiert, im Anschluss gewaschen, in wirkstofffreiem Medium aufgenommen und entweder mit Licht bestrahlt (+LED; 660 nm, 100 J/cm<sup>2</sup>, 30 mW/cm<sup>2</sup>) oder im Dunkeln kultiviert (-LED). Die Analyse der Zellvitalität (A) und Anteile apoptotischer oder nekrotischer Zellen erfolgte durchflusszytometrisch unter Färbung mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC.

## 5.4 AIR-3 vermittelte Aufnahme der Cytostatika 5-Fluoruracil und 5-Fluor-2'-desoxyuridin

Der Einbau Nukleosid analoger Cytostatika in die hIL-6R bindenden Aptamere AIR-3 und AIR-3A wurde zum Zweck zellspezifischer Inhibition der Proliferation hIL-6R präsentierender Zellen angestrebt. Nachdem für die Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  die Internalisierung des Aptamers AIR-3A und seine Prozessierung ins späte Endosom sowie Lysosom nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 5.1.3.2), wurde geprüft, ob sich diese intrazelluläre Lokalisation zur Freisetzung von 5-Fluoruracil (5-FU) bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FUdR) eignet. Hierbei wurden 5-FU als 5-Fluoruridin bzw. 5-FUdR im Austausch für Uridin in das RNA-Aptamer-Molekül integriert. Die intrazelluläre Freisetzung sollte aufgrund der in Abschnitt 1.4 beschriebenen Wirkungsweisen zur Inhibition der Proliferation bzw. Einleitung der Apoptose führen.

### 5.4.1 Intrinsische Modifikation von AIR-3 mit 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin

Varianten des RNA-Aptamers AIR-3, in denen Uridin gegen 5-Fluoruridin (AIR-3-FU) bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin (AIR-3-FdU und AIR-3-FdU-2'FC) ausgetauscht wurden, konnten durch *in vitro*-Transkription hergestellt werden. AIR-3-FU konnte mit dem Wildtyp der T7-RNA-Polymerase unter Verwendung von 5-FUTP anstelle von UTP (siehe Abschnitt 4.1.2) hergestellt werden. Die Transkriptionsausbeuten mit 5-FUTP entsprachen denen der Reaktion mit UTP wenn alle NTPs mit einer Endkonzentration von 1,25 mM eingesetzt

wurden. Um verhältnismäßig teures 5-FUTP zu sparen, wurde untersucht, inwieweit Transkriptionen mit niedrigeren 5-FUTP-Konzentration durchgeführt werden können. Dabei konnte die Konzentration von 5-FUTP auf 0,5 mM ohne Ausbeuteverluste gesenkt werden, wenn die GTP-Konzentration gleichzeitig auf 2 mM angehoben wurde.

Die Varianten AIR-3-FdU und AIR-3-FdU-2'FC wurden mit der Variante Y639F der T7-RNA-Polymerase hergestellt. Für AIR-3-FdU wurde 5-FdUTP anstelle von UTP in die Reaktion eingesetzt. Es wurden Ausbeuten vergleichbar denen der *in vitro*-T7-Transkription mit 2'-FUTP erhalten. Für AIR-3-FdU-2'FC wurde zudem 2'-FCTP anstelle von CTP in die Reaktion eingesetzt. Auch hier ergaben sich Ausbeuten vergleichbar denen der *in vitro*-T7-Transkription mit 2'-FUTP anstelle von 5-FdUTP. Die optimierten Konzentrationen der Nukleosidtriphosphate in der Reaktion sind in Abschnitt 4.1.2 angegeben.

#### 5.4.2 Bindungsanalyse von 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3

Nach Reinigung und radioaktiver Markierung (Abschnitt 4.2.1) der 5-FU- und 5-FUdR-modifizierten RNAs wurden diese bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an rekombinantes Zielprotein (hier Hyper-IL-6, das Fusionsprotein aus dem extrazellulären Teil von hIL-6R und hIL-6) untersucht. Hierfür wurden Filterretentionsanalysen durchgeführt.

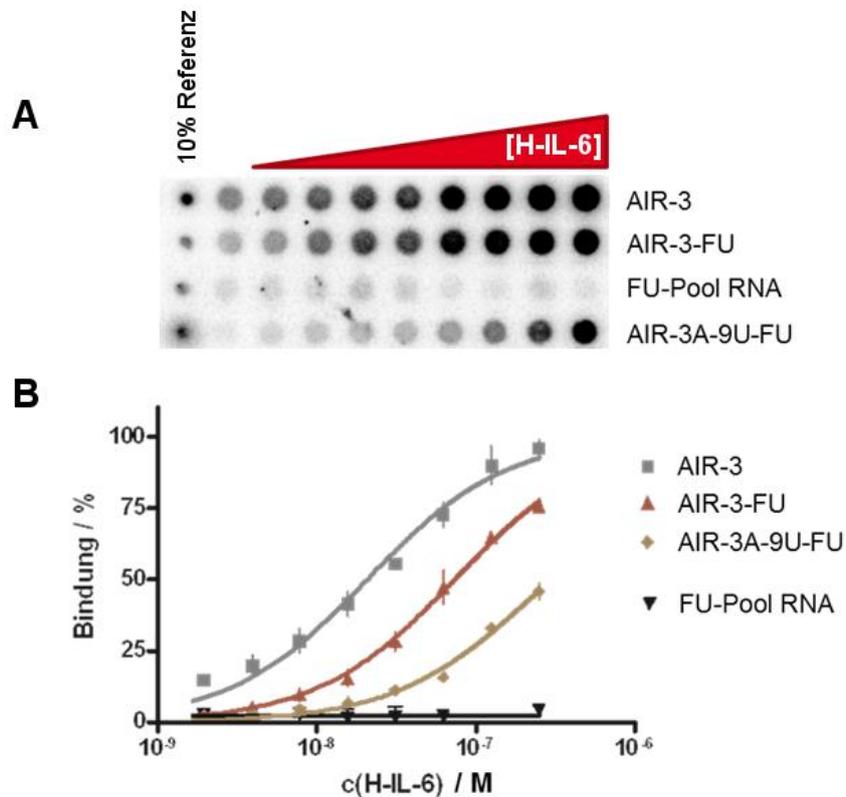
Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der 5-FU-modifizierten Aptamervarianten. Es wurden zwei verschiedene Varianten untersucht: 1) AIR-3-FU, das unverkürzte Aptamer AIR-3 (106 nt) mit insgesamt 30 5-FU-Einheiten. 2) AIR-3A-9U-FU, das verkürzte Aptamer AIR-3A (19 nt) mit einer 3'-terminalen Verlängerung um neun 5-FU-Nukleotide (Gesamtlänge: 28 nt). Zudem wurde eine Negativkontrolle erstellt, um unspezifische RNA-Protein-Interaktionen aufgrund von 5-FU generell (z. B. hydrophobe Wechselwirkungen) auszuschließen. Als Negativkontrolle wurde die 5-FU-modifizierte RNA des unselektierten SELEX-Pools R1 (FU-Pool-RNA) verwendet. Die berechneten Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ), der maximal gebundene Anteil an RNA ( $B_{max}$ ) und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Kurvenregression (Fit) sind in

Tabelle 19 angegeben.

Aus den Bindungsstudien wurde für AIR-3-FU eine konzentrationsabhängige Bindung an Hyper-IL-6 (H-IL-6) detektiert und ein  $K_d$ -Wert von  $74,1 \pm 8,2$  nM bestimmt. Damit führte der Austausch aller 30 Uridine aus AIR-3 gegen 5-F-Uridine zu einer Abnahme der Bindungsstärke um weniger als eine Größenordnung (AIR-3:  $K_d = 20,9 \pm 2,6$  nM). Durch die

## ERGEBNISSE

nicht vorhandene Bindung von FU-Pool-RNA an H-IL-6 konnte unspezifische Bindung durch die 5-FU-Modifikation ausgeschlossen werden.



**Abbildung 32: Filterretentionsanalysen der 5-FU-modifizierten Aptamervarianten.** A) Für die Analyse der Interaktion der 5-FU-modifizierten RNAs wurde das Zielprotein Hyper-IL-6 (H-IL-6) in steigender Konzentration (0-500 nM) mit der jeweiligen radioaktiv markierten RNA (< 2 nM) in PBS inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Am Filter zurückgebliebene Mengen der RNA wurden autoradiographisch detektiert. B) Der Anteil prozentualer Bindung der RNA wurde gegen die Proteinkonzentration von H-IL-6 aufgetragen und mittels *one-site-binding*-Modell angepasst. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei (AIR-3 und FU-Pool-RNA) bzw. drei (AIR-3-FU und AIR-3A-9U-FU) Messungen.

**Tabelle 19: Ergebnisse der aus den Filterretentionsanalysen berechneten Bindungsstärken der 5-FU-modifizierten Aptamervarianten.**

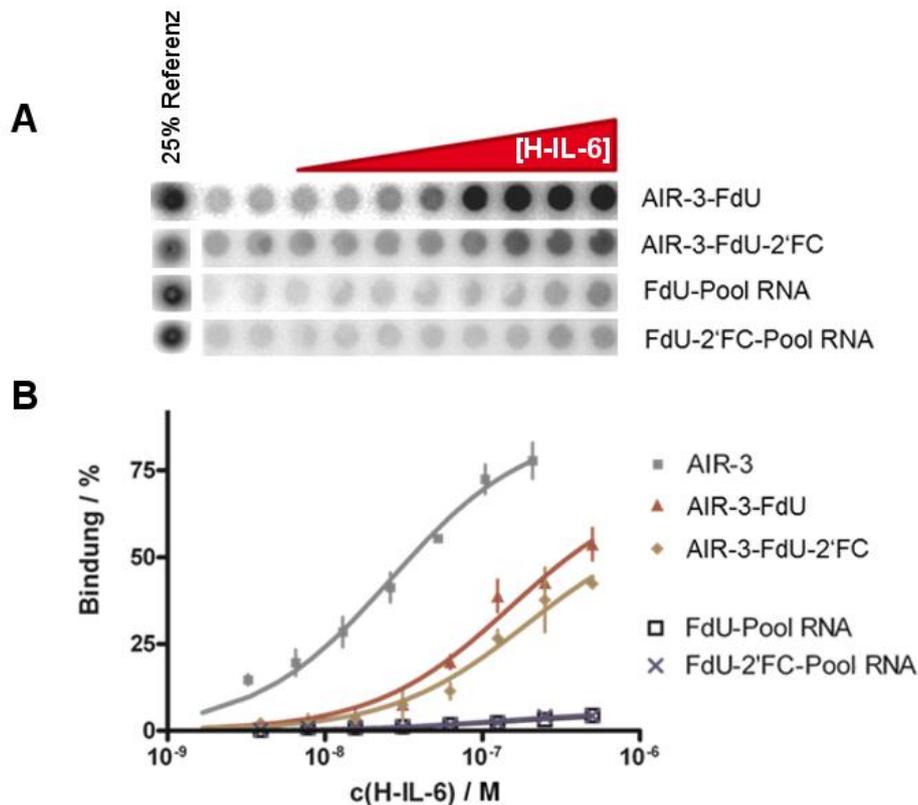
RNA	$K_d$ / nM	$B_{max}$ / %	Fit ( $R^2$ )
AIR-3	$20,9 \pm 2,6$	$100,0 \pm 3,6$ *	0,9782
AIR-3-FU	$74,1 \pm 8,2$	$99,9 \pm 4,5$	0,9884
FU-Pool RNA	-----	-----	-----
AIR-3A-9U-FU	$224,0 \pm 42,2$	$87,3 \pm 9,6$	0,9827

\*  $B_{MAX}$  wurde im Fall der Kurvenregression von AIR-3 aus Rationalitätsgründen auf 100% beschränkt. Die unbeschränkten Ergebnisse lieferten  $B_{max} = 103,9\%$  mit ähnlichen Werten für  $K_d$  und  $R^2$  wie denen in der Tabelle.

Für AIR-3A-9U-FU wurde eine stärkere Abnahme der Bindung zu H-IL-6 ermittelt ( $K_d = 20,9 \pm 2,6$  nM). In diesem Fall verschlechterte sich die Affinität gegenüber AIR-3 um eine Größenordnung. Aufgrund der deutlich geringeren Affinität dieser Variante wurde für

## ERGEBNISSE

anschließende Zellexperimente Abstand von Varianten bzw. Konstrukten des verkürzten Aptamers AIR-3A genommen. Weitere Ausführungen hierzu werden in der Diskussion dieser Arbeit gegeben.



**Abbildung 33: Filterretentionsanalysen der 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten.** A) Für die Analyse der Interaktion der 5-FUdR-modifizierten RNAs wurde das Zielprotein Hyper-IL-6 (H-IL-6) in steigender Konzentration (0-250 nM) mit der jeweiligen radioaktiv markierten RNA (< 2 nM) in PBS inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Am Filter zurückgebliebene Mengen der RNA wurden autoradiographisch detektiert. B) Der Anteil prozentualer Bindung der RNA wurde gegen die Proteinkonzentration von H-IL-6 aufgetragen und mittels *one-site-binding*-Modell angepasst. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen.

**Tabelle 20: Ergebnisse der aus den Filterretentionsanalysen berechneten Bindungsstärken der 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten.**

RNA	$K_d$ / nM	$B_{max}$ / %	Fit ( $R^2$ )
AIR-3-FdU	$151 \pm 3$	$71,2 \pm 6,0$	0,9450
AIR-3-FdU-2'FC	$191 \pm 6$	$61,2 \pm 8,1$	0,9296
FdU-Pool RNA	-----	-----	-----
FdU-2'FC-Pool RNA	-----	-----	-----

Abbildung 33 stellt die Ergebnisse der Bindungsstudien mit 5-FUdR-modifizierten Varianten von AIR-3 dar. Untersucht wurden zwei Aptamervarianten: 1) AIR-3-FdU, in dem alle 30

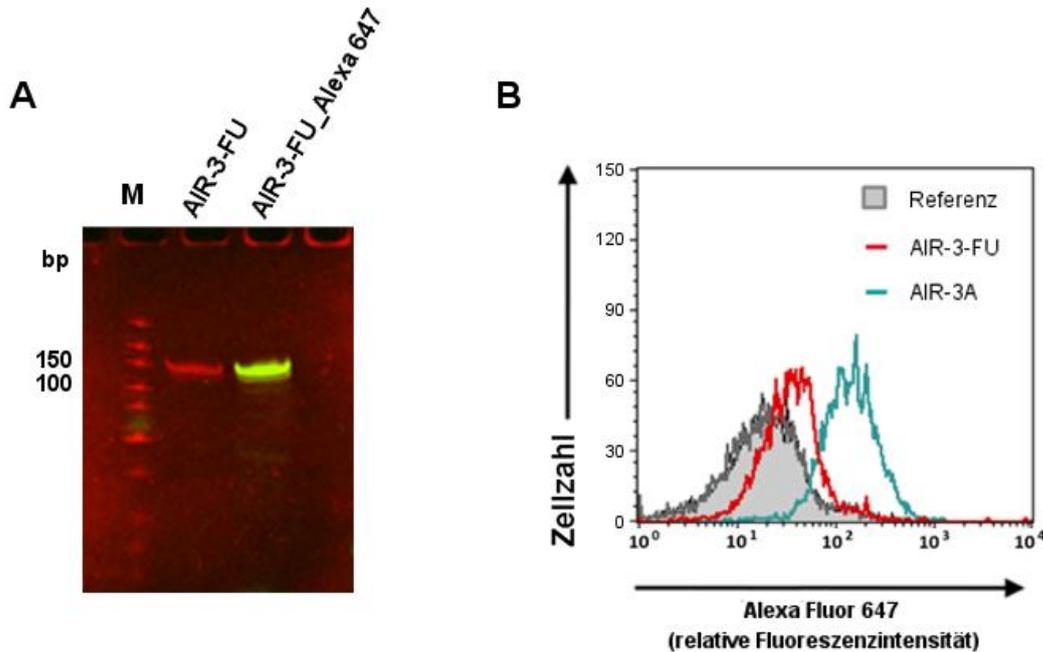
Uridine aus AIR-3 durch 5-F-2'-Desoxyuridine ausgetauscht wurden. 2) AIR-3-FdU-2'FC, in dem alle 30 Uridine aus AIR-3 durch 5-F-2'-Desoxyuridine und alle 15 Cytidine durch 2'-F-Cytidine ausgetauscht wurden. Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Varianten der unselektierten RNA des SELEX-Pools R1 verwendet (FdU-Pool RNA und FdU-2'FC-Pool RNA).

Sowohl für AIR-3-FdU ( $K_d = 151 \pm 3$  nM) als auch für AIR-3-FdU-2'FC ( $K_d = 191 \pm 6$  nM) wurde eine deutliche Abnahme der Affinität für H-IL-6 um annähernd eine Größenordnung ermittelt. Es wurde ebenfalls ein Rückgang des maximalen Anteils gebundener RNA für beide Varianten beobachtet. Unspezifische Bindungen an das Protein, die auf den Austausch der Nukleoside gegen die modifizierten Analoga zurückgehen, konnten durch die entsprechenden Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

### 5.4.3 Bindungsanalyse von 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3 an hIL-6R tragende Zellen

Zur Überprüfung der Bindung von 5-FU modifiziertem AIR-3 an hIL-6R positive Zellen, wurde die RNA 3'-fluoreszenzmarkiert. Die über 3'-terminale Glycolspaltung und Kupplung mit Alexa647-Hydrazid markierte RNA wurde gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 34A) und deren Bindung an hIL-6R positive BaF3-Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 34B und Abbildung 16D).

Die Fluoreszenzmarkierung von AIR-3-FU lieferte keine quantitative Markierung der RNA. Die Ausbeute der Markierungsreaktion (siehe Abschnitt 4.2.2) betrug ca. 63%. Bestimmt wurde dieser Wert durch photometrische Bestimmung der Alexa647-Konzentration (Fluoreszenz bei 695 nm) sowie der RNA-Konzentration (Absorption bei 260 nm). Die in Abbildung 34B angegebene Konzentration bezieht sich auf die RNA-Konzentration, von der also gut ein Drittel unmarkiert war. Dies erklärt zum Teil, dass die Fluoreszenzverschiebung in Abbildung 34B für AIR-3-FU deutlich geringer ausfiel als für die Positivkontrolle AIR-3A (5'-fluoreszenzmarkiert mit Alexa647, käuflich erworben). Aus der in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Quantifizierung wurde eine durchschnittliche Anzahl von 3.746 RNA-Molekülen pro Zelle bestimmt, unter Berücksichtigung des Anteils an markierter RNA. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante von AIR-3-FU wurde im weiteren mittels indirekter Bindungstests durchgeführt.

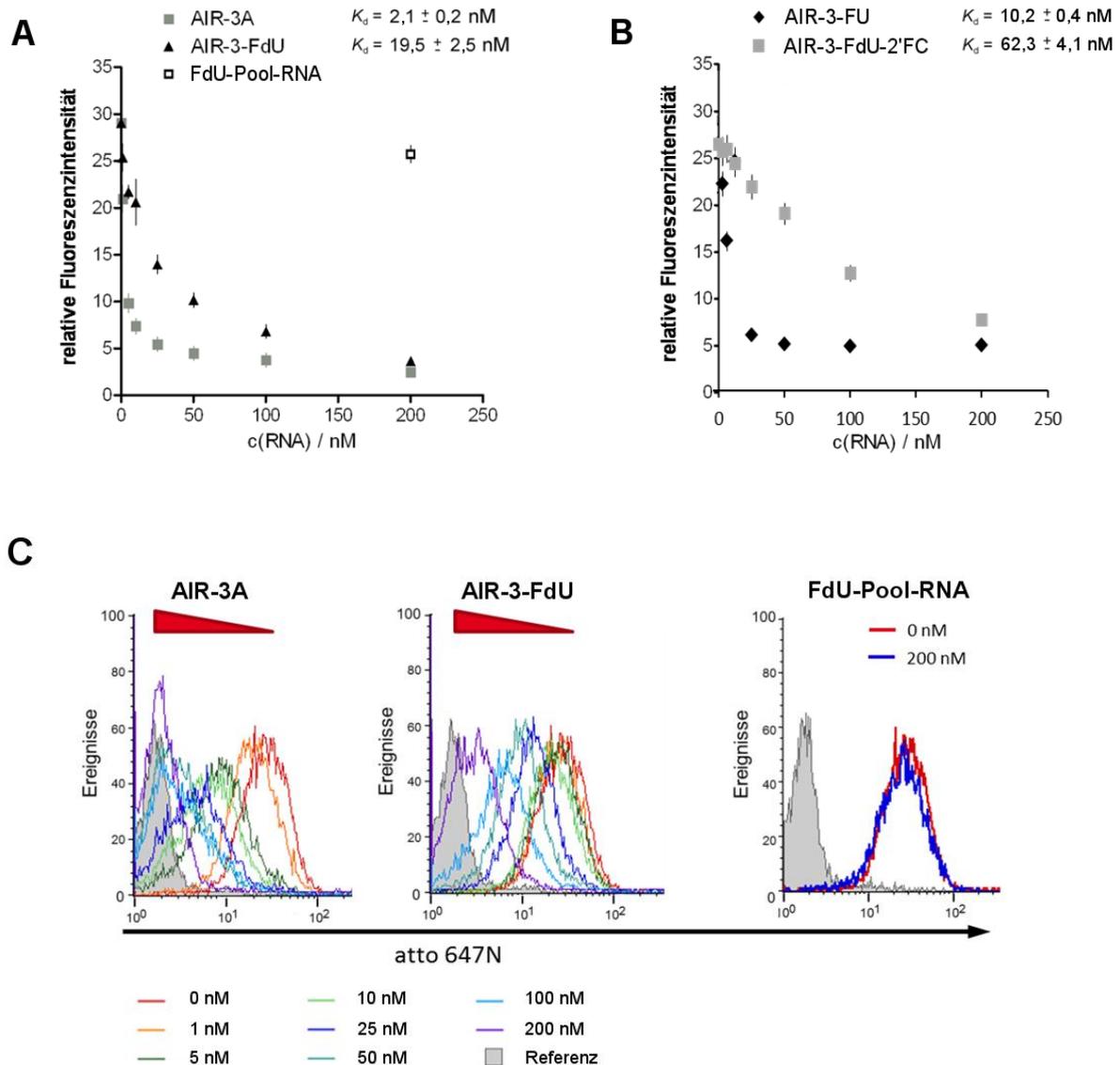


**Abbildung 34: Analyse der 3'-Alexa647-markierten RNA AIR-3-FU.** A) Gelelektrophoretische Analyse von AIR-3-FU vor und nach der Fluoreszenzmarkierung (10% PAA-Gel, 8 M Harnstoff). M: Marker, DNA Ultra-Low-Range-Ladder. Detektion: Ethidiumbromid (rot), Fluoreszenz BP 695 nm (grün, Alexa647). B) Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von AIR-3-FU an hIL-6R positiven BaF3-Zellen. Für die Analyse der Bindung wurden die Inkubationsbedingungen gewählt, die in den Zytotoxizitätsexperimenten verwendet wurden (100 nM RNA, 20 min bei 37 °C in serumfreiem Medium, anschließend dreimaliges Waschen mit PBS).

Die Analyse der Bindung von 5-FUdR-modifiziertem AIR-3 wurde über einen indirekten Bindungstest an hIL-6R positive BaF3-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurden die Zellen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten zuerst mit unmarkiertem AIR-3-FdU (in einer Reihe mit steigenden Konzentrationen) und anschließend mit Atto647N fluoreszenzmarkiertem AIR-3A (mit einer Sättigungskonzentration von 100 nM) inkubiert (siehe Abschnitt 4.5.5.3). Zur Validierung dieser Methode wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit unmarkiertem AIR-3A im ersten Inkubationsschritt durchgeführt und ausgewertet (Abbildung 35A und C). Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von AIR-3A betrug  $2,1 \pm 0,2$  nM. Für AIR-3-FdU wurde die Dissoziationskonstante mit  $K_d = 19,5 \pm 2,5$  nM bestimmt. Für die 5-FUdR-modifizierte RNA-Bibliothek wurde keine kompetitive Bindung an hIL-6R positiven BaF3-Zellen festgestellt.

Als weitere Varianten wurden AIR-3-FU und AIR-3-FdU-2'FC bezüglich ihrer Bindung an hIL-6R positiven BaF3-Zellen untersucht. Für beide Varianten wurde eine kompetitive Bindung an AIR-3A ermittelt. Für AIR-3-FU wurde die Dissoziationskonstante mit  $K_d = 10,2 \pm 0,4$  nM, für AIR-3-FdU-2'FC mit  $K_d = 19,5 \pm 2,5$  nM bestimmt (Abbildung 35B).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 35: Analyse der Bindung von 5-FU- und 5-FUdR-modifizierten Aptamervarianten an hIL-6R positiven BaF3-Zellen.** A) Bindungsanalyse von AIR-3-FdU, FdU-Pool-RNA und AIR-3A (Positivkontrolle) an hIL-6R präsentierenden BaF3 Zellen. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie anhand einer zweiten Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem AIR-3A ermittelt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-200 nM) unmarkierter zu analysierender RNA in PBS für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Atto647N-markiertem AIR-3A (100 nM) in PBS für 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Bindende Spezies führten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Fluoreszenzintensität herbei. B) Bindungsanalyse von AIR-3-FU und AIR-3-FdU-2'FC. C) Durchflusszytometrische Primärdaten der Bindungsanalysen von AIR-3A, AIR-3-FdU und FdU-Pool-RNA.

### 5.4.4 Stabilität von 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3

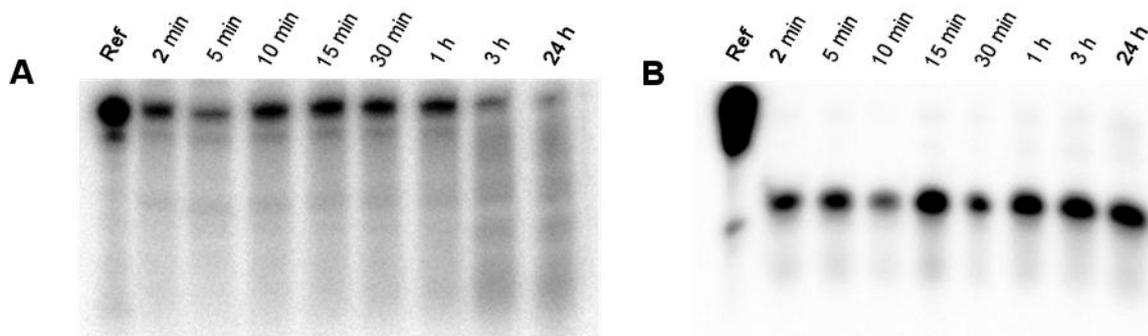
Die Stabilität der 5-FUdR-modifizierten Varianten von AIR-3 wurde in Zellkulturmedium in Ab- und Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) untersucht. Abbildung 36 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Stabilitätstests mit 5'-terminal radioaktiv markiertem

## ERGEBNISSE

AIR-3-FdU. Die Halbwertszeit der Vollängen-RNA von AIR-3-FdU in Zellkulturmedium (DMEM) ohne FKS betrug ca. 3 h (Abbildung 36A). In 10% FKS beinhaltendem DMEM wurde eine schnelle Degradierung ( $t < 2$  min) von AIR-3-FdU zu einem verkürzten Fragment beobachtet (Abbildung 36B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die anschließend dokumentierten Zellexperimente zur spezifischen Aufnahme von AIR-3-FdU in hIL-6R positiven BaF3-Zellen in Abwesenheit von FKS durchgeführt.

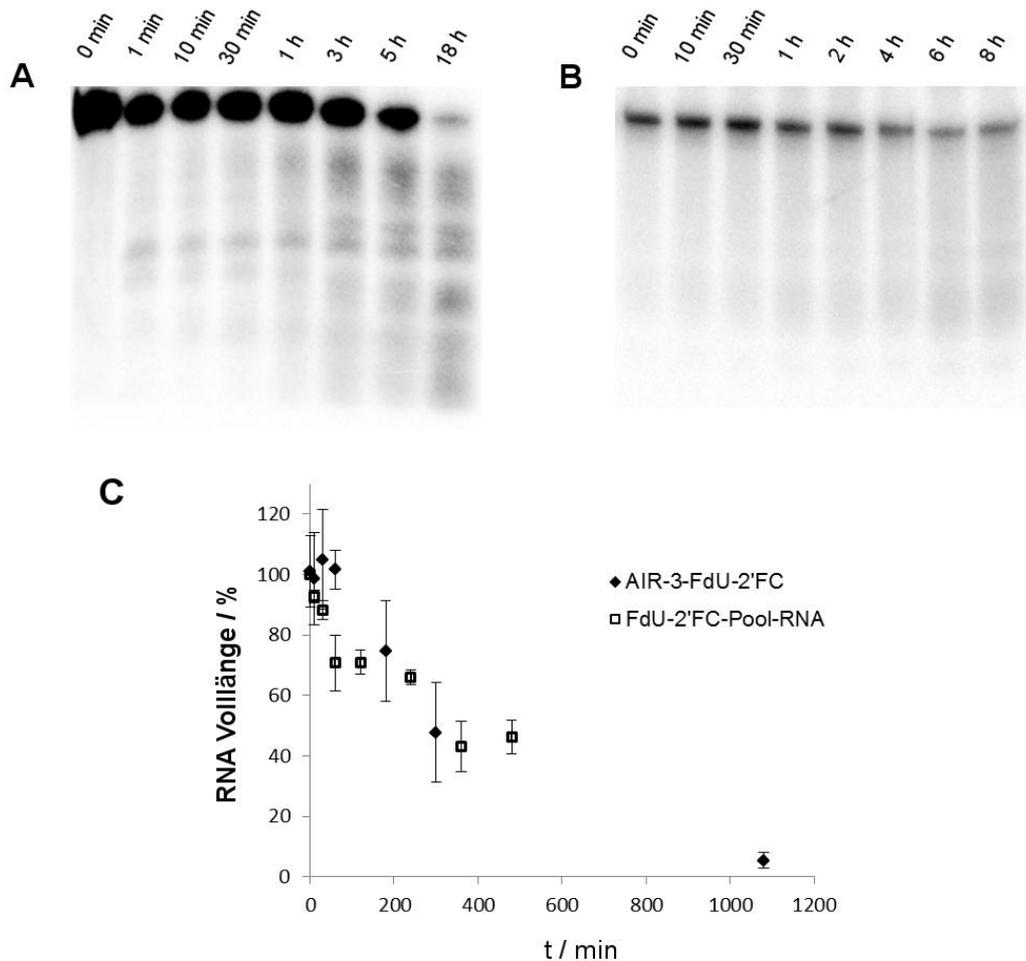
Um eine erhöhte Stabilität des FdU-modifizierten Aptamers in Anwesenheit von FKS zu gewährleisten, wurde die Variante AIR-3-FdU-2'FC hergestellt und ebenfalls bezüglich ihrer Stabilität in Anwesenheit von FKS untersucht. Durch den Austausch der kanonischen Cytidine gegen deren 2'-Fluor-modifiziertes Derivat enthielt diese keine 2'-OH-Pyrimidinnukleotide, so dass sie als hinreichend geschützt gegen Degradierung durch Nukleasen der RNase A-Familie betrachtet werden kann. Ebenfalls untersucht wurde die Stabilität der analog modifizierten RNA-Bibliothek (FdU-2'FC-Pool-RNA), einer geeigneten Negativkontrolle für Zellkulturexperimente, in 10% FKS beinhaltendem DMEM.

Die gelelektrophoretische Analyse der Stabilitätstests von AIR-3-FdU-2'FC sowie der FdU-2'FC-Pool-RNA in 10% FKS beinhaltendem DMEM ist in Abbildung 37A und Abbildung 37B wiedergegeben. Für AIR-3-FdU-2'FC wurde eine Halbwertszeit der Vollängen-RNA von ca. 5 h ermittelt. Für die FdU-2'FC-Pool-RNA wurde ebenfalls eine Halbwertszeit von ca. 5 h erhalten (Abbildung 37C).



**Abbildung 36: Stabilitätstest von AIR-3-FdU.** Die Aptamervariante AIR-3-FdU wurde 5'-terminal radioaktiv markiert und in DMEM ohne FKS (A) bzw. DMEM mit 10% Vol. (B) bei 37 °C inkubiert, nach den angegebenen Zeiten in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend elektrophoretisch getrennt (10% PAA, 8 M Harnstoff) und autoradiographisch analysiert.

## ERGEBNISSE



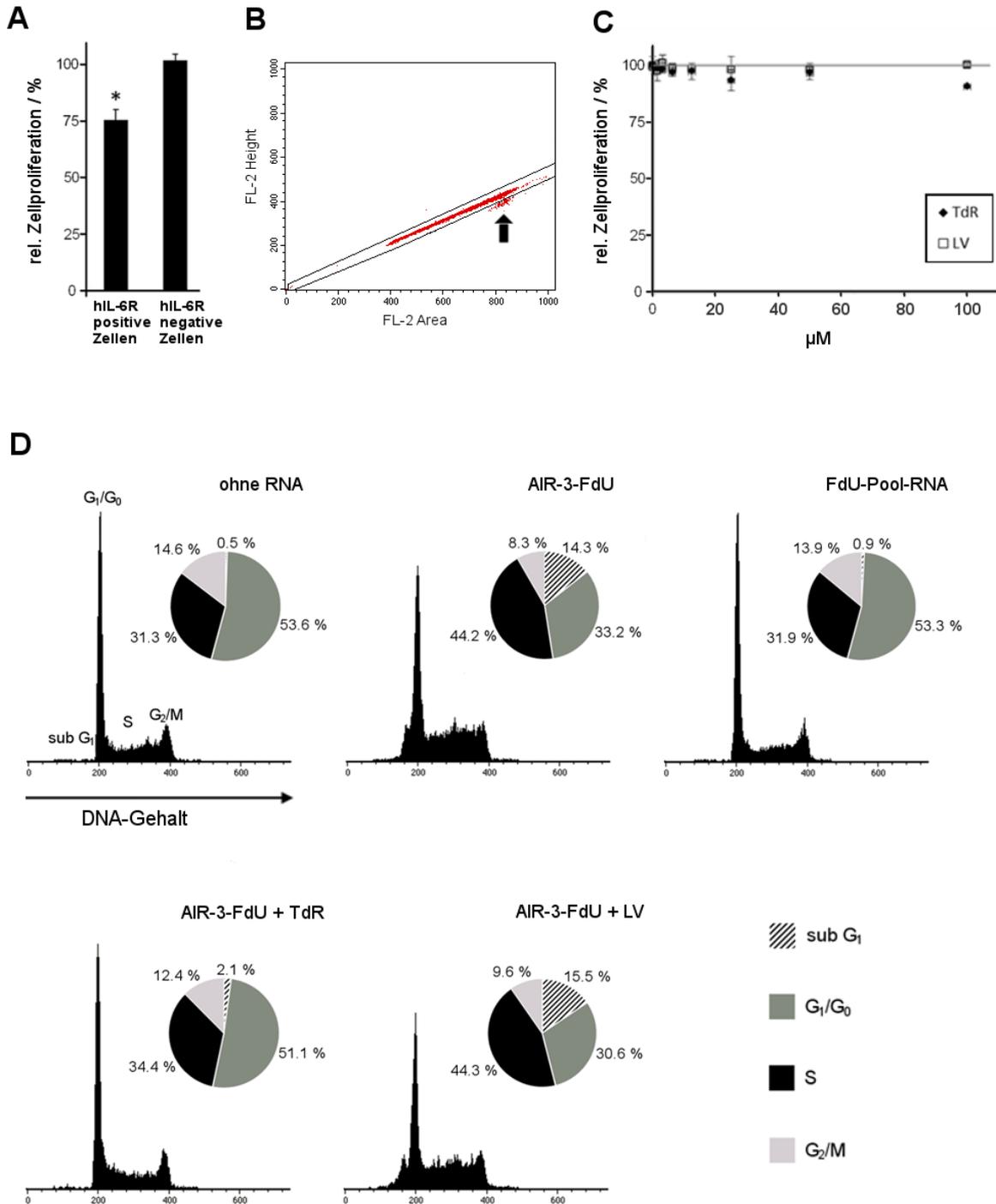
**Abbildung 37: Stabilitätstest von AIR-3-FdU-2'FC und FdU-2'FC-Pool-RNA in Anwesenheit von FKS.** Die Aptamervariante AIR-3-FdU-2'FC und FdU-2'FC-Pool-RNA wurden 5'-terminal radioaktiv markiert und in DMEM mit 10% Vol. (B) bei 37 °C inkubiert, nach den angegebenen Zeiten in flüssigem Stickstoff gefroren, anschließend elektrophoretisch getrennt (10% PAA, 8 M Harnstoff) und autoradiographisch analysiert.

### 5.4.5 Zytotoxische Wirkung des mit 5-Fluoruracil bzw. 5-Fluor-2'-desoxyuridin modifiziertem AIR-3 auf hIL-6R tragende Zellen

Zunächst wurden Zytotoxizitätsstudien mit den 5-FU-modifizierten Aptamervarianten AIR-3-FU und AIR-3A-9U-FU Zytotoxizitätstest durchgeführt. Aus diesen Experimenten konnte jedoch keine spezifische durch das Aptamer vermittelte Zytotoxizität nachgewiesen werden. Im Diskussionsteil dieser Arbeit sind im Abschnitt 6.2.2 die Erkenntnisse und Schlussfolgerungen dieser Studien zusammengefasst.

Für AIR-3-FdU konnte nach Etablierung geeigneter Versuchsbedingungen ein spezifischer Einfluss auf die Zellvitalität von hIL-6R positiven BaF3-Zellen detektiert werden.

# ERGEBNISSE



**Abbildung 38: Analyse des spezifischen zytotoxischen Effekts von AIR-3-FdU auf hIL-6R positive BaF3-Zellen.** A) Proliferationsrückgang von hIL-6R positiven BaF3-Zellen gegenüber hIL-6R negativen BaF3-Zellen nach Inkubation mit 250 nM AIR-3-FdU für 45 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in serumfreiem DMEM. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen dreimal gewaschen, für 44 h in serumhaltigem Medium kultiviert und die relative Proliferation mittels Resazurin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen zweier unabhängiger Experimente (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit \* gekennzeichnet. B) Gating zum Ausschluss von Zelldubletten in der Zellzyklusanalyse. Zelldubletten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. C) Analyse des 24h-Einflusses von 2'-Desoxythymidin (TdR) und Leucovorin (LV; Konz. beziehen sich auf den Anteil der biologisch aktiven *levo*-Form des verwendeten Racemats) auf die Zellvitalität. D) Zellzyklusanalyse von hIL-6R positiven BaF3-Zellen. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> mit 100 nM AIR-3-FdU bzw. FdU-Pool-RNA in serumfreiem DMEM inkubiert und nach 3-maligem Waschen in serumhaltigem DMEM ohne RNA kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse wurden die Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt (siehe Abschnitt 4.5.5.5). Die angegebenen Werte entstammen einer Doppelbestimmung.

Abbildung 38A zeigt den spezifischen Rückgang der Proliferation von hIL-6R positiven BaF3-Zellen gegenüber hIL-6R negativen BaF3-Zellen durch AIR-3-FdU. Die Zellen wurden hierfür zunächst einmalig einer 45-minütigen Inkubation mit 250 nM AIR-3-FdU in serumfreiem Medium unterzogen und nach anschließendem Wachen in serumhaltigem Medium ohne RNA kultiviert. Das Maß der Vitalität wurde in Form eines Proliferationstests mit Resazurin 44 h nach der Inkubation mit AIR-3-FdU durchgeführt. Für hIL-6R positive Zellen wurde ein Proliferationsrückgang von  $24,8 \pm 4,2\%$  festgestellt (in Relation zu gleichbehandelten Kontrollzellen ohne RNA in der ersten Inkubationsphase). Für hIL-6R negative Zellen erfolgte keine Beeinträchtigung der Vitalität.

Folgend wurde untersucht, ob dieser antiproliferative Effekt auf 5-FdUMP oder einen anderen der in Abschnitt 1.4 beschriebenen Antimetabolite von 5-FU zurückgeführt werden kann. Hierfür wurden Zellzyklusanalysen der Zellen nach Inkubation von AIR-3-FdU gemäß Abschnitt 4.5.5.5 durchgeführt. Dafür wurden Zellen fixiert, permeabilisiert und der mit Propidiumiodid gefärbte relative DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dies ermöglichte die Zuordnung der Zellzyklusphasen ( $G_1/G_0$ , S,  $G_2/M$ ). Fälschliche  $G_2/M$ -Ereignisse durch Zelldubletten wurden durch *Gating* der Zellereignisse entlang einer Geraden aus der Signalthöhe/Signalfläche-Auftragung (*height* vs. *area*) der Propidiumiodid-Fluoreszenz (FL-2) ausgeschlossen (Abbildung 38B).

Das 5-FUdR modifizierte Aptamer bedingte einen anteiligen Zuwachs der S-Phase Population von  $31,3 \pm 1,8\%$  (unbehandelte Zellen) auf  $44,2 \pm 1,1\%$  (Abbildung 38D). Zudem wurde nach Inkubation mit AIR-3-FdU ein Anteil von apoptotischen Zellen (hypodiploide Zellen, gekennzeichnet als sub G1) mit  $14,3 \pm 0,5\%$  detektiert. Ein solcher S-Phase Arrest ist ein typischer Effekt, den FdUMP durch Inhibition der Thymidylat-Synthase (TS) erzeugt. Freies 5-FUdR wirkte sich in Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  auf BaF3 Zellen bei einer Inkubation für mindestens 5 h in gleicher Weise aus [256].

Der S-Phasen-Arrest konnte verhindert werden, wenn das Experiment in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  2'-Desoxythimin (TdR), einem Antidot zu FdUMP, durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen verursachte AIR-3-FdU im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Daraus kann geschlossen werden, dass 5-FdUMP der aktive Antimetabolit ist. Es wurde zudem versucht, den antiproliferativen Effekt durch Zusatz von Leucovorin (LV), einer Vorstufe des 5,10-Methylentetrahydrofolats ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ), einem Co-Substrat der TS 5,10-Methylentetrahydrofolat ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ), zu verstärken. Allerdings übte LV keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation aus sondern führte nur zu einer leichten Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen ( $15,5 \pm 0,8\%$ ). Sowohl TdR als auch LV alleine hatten keinen Einfluss auf die Zellen (Abbildung 38C).

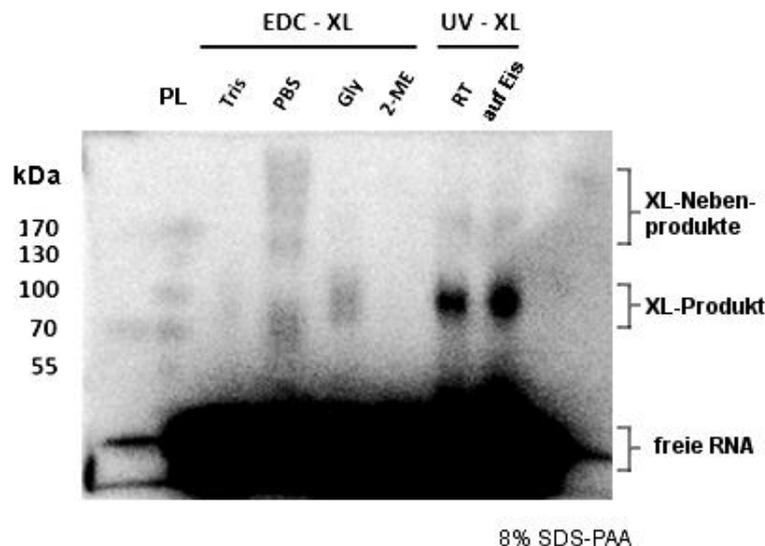
Nach Inkubation mit der Negativkontroll-RNA (FdU-Pool-RNA) wurden keine signifikanten Veränderungen in der Verteilung der Zellzyklusphasen gegenüber den Kontrollzellen ohne RNA festgestellt. Ebenso wurden in diesem Fall keine apoptotischen Zellen detektiert.

## 5.5 Bindungsstellenanalyse mittels kovalenter Verknüpfung des RNA Aptamers mit dem Zielprotein Hyper-IL-6

Zur Analyse der Bindungsfläche zwischen dem RNA-Aptamer AIR-3A und hIL-6R wurden Methoden der spezifischen kovalenten Verknüpfung des Aptamer-Zielprotein-Komplexes etabliert. Aus diesem Konjugat konnten Informationen über die beteiligten Reste der kovalenten Verknüpfung gewonnen werden, indem 1. die chemische Natur der Verknüpfung über dessen Stabilität untersucht wurde, 2. die RNA des kovalenten Komplexes systematisch fragmentiert wurde und 3. das Protein aus dem kovalenten Komplex enzymatisch (Trypsin) fragmentiert und massenspektrometrisch analysiert wurde.

### 5.5.1 Cross Linking von AIR-3 bzw. AIR-3A an Hyper-IL-6

Die kovalente Verknüpfung (*cross linking*, XL) von AIR-3 oder AIR-3A und Hyper-IL-6 erfolgte durch Reaktion mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) oder photoaktiviert durch UV-Bestrahlung (254 nm). Für die beiden Methoden wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen untersucht (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Cross linking (XL) von AIR-3 an das Zielprotein Hyper-IL-6.** Die kovalente Verknüpfung von RNA und Protein erfolgte nach Inkubation (20 min bei RT) von ca. 1  $\mu$ M Protein und ca. 100 nM radioaktiv markierter RNA in 1x Selektionspuffer durch Zugabe von EDC (finale Konz. 50 mM; EDC-XL) oder durch UV-Bestrahlung (254 nm, 4 W-Lampe mit 3 cm Abstand zur Probe, 5 min; UV-XL). Für das EDC-cross-linking (EDC-XL, siehe Abschnitt 4.4) wurden unterschiedliche Quenching-Reagenzien verwendet: Tris [100 mM Tris (pH 7,4)], PBS (10x PBS), Gly (1 M Glycin-Lösung), 2-ME (5%ige 2-Mercaptoethanol-Lösung). Anschließend wurden die Proben mit 3x-SDS-Ladepuffer versetzt, 2 min bei 80 °C inkubiert und in einem SDS-haltigen PAA-Gel (8%, Glycin gepuffert) elektrophoretisch getrennt. PL: Prest. Protein-Ladder, nachträglich radioaktiv angefärbt.

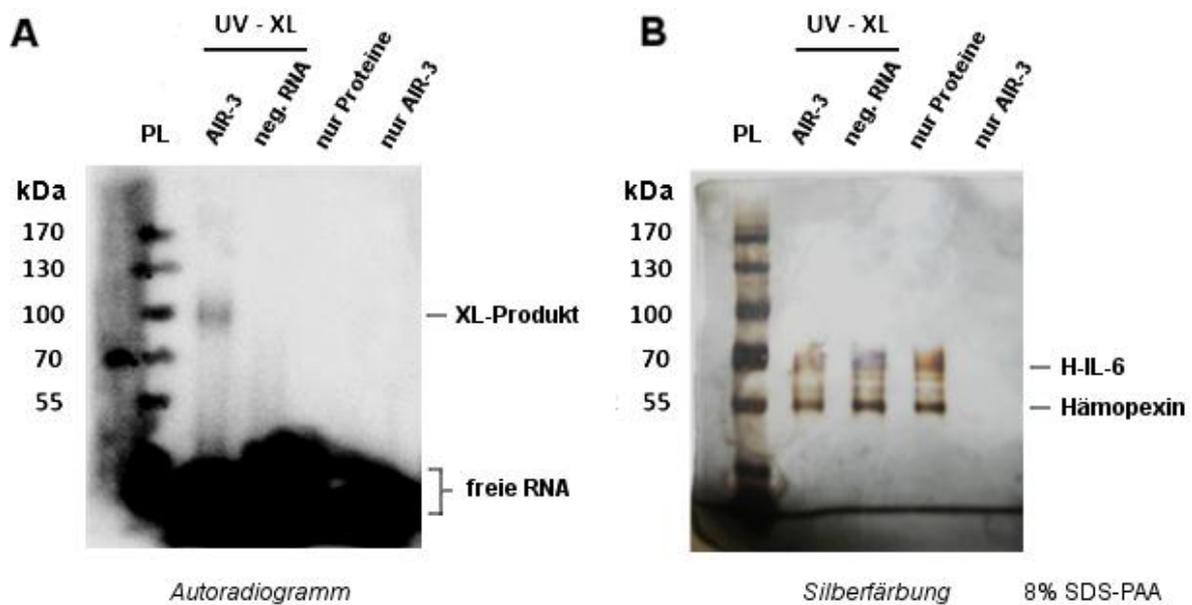
## ERGEBNISSE

Das UV-aktivierte *cross linking* (UV-XL) lieferte deutlich höhere Ausbeuten an XL-Produkt (2-5% der eingesetzten RNA) als das EDC-aktivierte *cross linking* (EDC-XL; < 1% der eingesetzten RNA) und wurde daher im Weiteren angewendet. Im Falle des UV-XL wurden ähnliche XL-Ausbeuten für die bei RT bzw. auf Eis durchgeführte Reaktion erhalten. Das EDC-*cross-linking* wurde bei RT durchgeführt. Es wurden für diese Reaktion verschiedene *Quenching*-Reagenzien zur Eliminierung überschüssigen EDCs getestet: 100 mM Tris pH 7,4 (Tris), Phosphat in Form von 10x PBS pH 7,2 (PBS), 100 mM Glycin (Gly) und 2 M 2-Mercaptoethanol (2-ME). Als am geeignetsten stellte sich Glycin heraus, bei dessen Verwendung nur eine XL-Produktbande in der erwarteten Laufhöhe (ca. 100 kDa) in der anschließenden elektrophoretischen Analyse detektiert wurde. Die Verwendung von Tris führte zu geringeren Ausbeuten an XL-Produkt gegenüber Glycin. Nach *Quenching* mit PBS wurde ein XL-Hauptprodukt mit geringerer Laufhöhe als erwartet (ca. 70-80 kDa) erhalten. Zudem wurden größere Mengen an XL-Nebenprodukten deutlich höherer Molekülmassen erhalten (ca. 150 kDa. und Produkte > 170 kDa). Dieses Phänomen könnte durch EDC-aktivierte intra- und intermolekulare Reaktionen des Proteins (z.B. zu Phosphoramidaten) bedingt sein. Die hierdurch eingeschränkte Entfaltung des Proteins im SDS-Puffer bzw. die kovalente Verknüpfung zweier oder mehrerer Proteinmoleküle wären eine Erklärung für die detektierten Produktbanden. Bei der Verwendung von 2-Mercaptoethanol wurde kein XL-Produkt detektiert. Dies kann auf die Thiol-vermittelte Spaltung der entstandenen Bindungen zwischen RNA und Protein begründet sein und wird in Abschnitt 6.3 diskutiert.

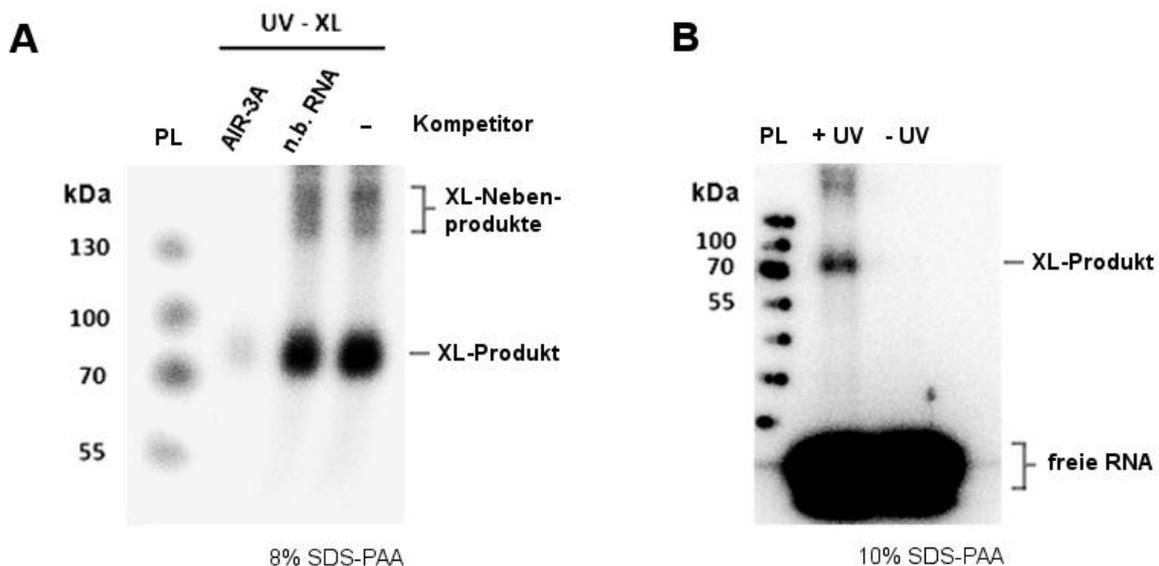
In der Folge wurde die UV-XL-Reaktion bezüglich Ausbeute optimiert (siehe Abschnitt 4.4.3) und ihrer Spezifität überprüft. Abbildung 40 und Abbildung 41 belegen, dass unter optimierten Bedingungen ausschließlich RNA aus dem Aptamer-Zielprotein-Komplex zur Reaktion mit dem Protein neigt. Es konnten weder XL-Produkte zwischen der nicht bindenden RNA des unselektierten SELEX-Pools R1 (neg. RNA in Abbildung 40) noch zwischen AIR-3 und dem Referenzprotein Hämopexin detektiert werden.

Für das verkürzte Aptamer AIR-3A konnte ebenso die spezifische Bildung von XL-Produkten nachgewiesen werden. Die Bildung des radioaktiven XL-Produktes konnte durch einen 1000-fachen Überschuss von unmarkiertem AIR-3A als Kompetitor effektiv inhibiert werden, nicht jedoch durch einen 1000-fachen Überschuss unmarkierter nicht-bindender RNA (anti-TNF-R1-siRNA Pass-RNA, Sequenz siehe Abschnitt 3.4.2; Abbildung 41A). Die Bildung des kovalenten Komplexes erfolgte ausschließlich nach UV-Behandlung (Abbildung 41B). Die in Abbildung 41 markierten Nebenprodukte höherer Molekülmassen wurden in den XL-Experimenten mit steigenden Proteinkonzentrationen in stärkerem Maß erhalten. Daher wird vermutet, dass es sich hierbei um XL-Produkte mehrerer, aggregierter Proteinmoleküle handelt.

ERGEBNISSE



**Abbildung 40: Gelelektrophoretische Analyse der Spezifität des UV-XL von AIR-3 mit Hyper-IL-6.** Kovalente Konjugate von radioaktiv markiertem AIR-3 und Hyper-IL-6 (H-IL-6; apparentes Molekulargewicht: 68 kDa) wurden gemäß Abschnitt 4.4.3 erstellt und gelelektrophoretisch analysiert (8% SDS-PAA, Glycin gepuffert). Die Detektion des Gels erfolgte autoradiographisch (A) sowie durch Silberfärbung (B). Als Negativkontrolle dienten radioaktiv markierte nicht bindende RNA des SELEX-Pools R1 (neg. RNA) sowie das Protein Hämopexin (~ 55 kDa), welches in etwa gleichen molaren Konzentrationen in die Reaktion eingesetzt wurde wie H-IL-6. PL: Prest. Protein-Ladder, nachträglich radioaktiv angefärbt.

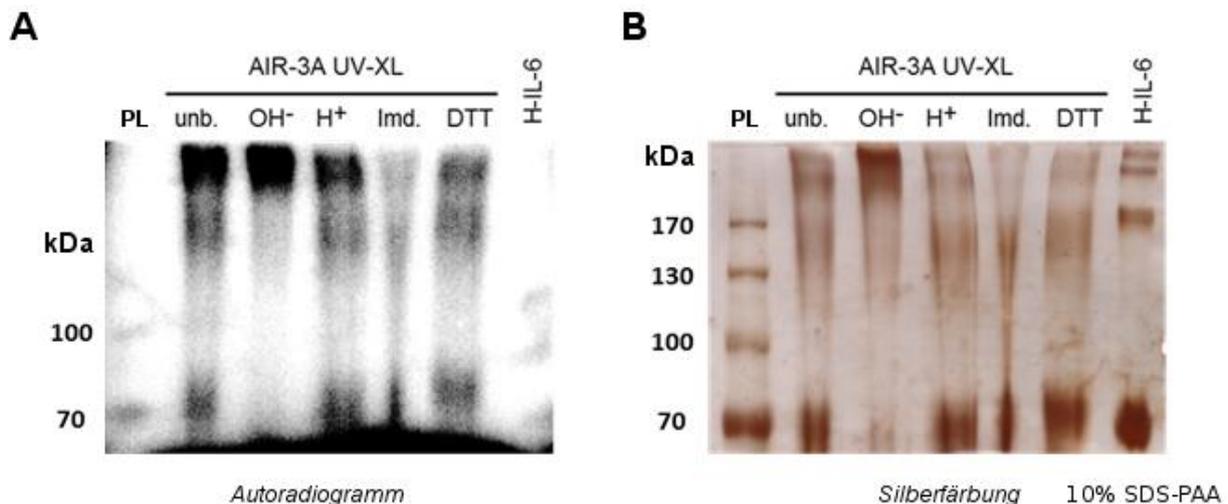


**Abbildung 41: Gelelektrophoretische Analyse der Spezifität des UV-XL von AIR-3A mit Hyper-IL-6.** Kovalente Konjugate von radioaktiv markiertem AIR-3A und Hyper-IL-6 (H-IL-6; ~ 68 kDa) wurden gemäß Abschnitt 4.4.3 erstellt und gelelektrophoretisch analysiert (A: 8% SDS-PAA, B: 8% SDS-PAA, jeweils Glycin gepuffert). A) Unter Anwesenheit eines 1000-fachen Überschuss' unmarkierten AIR-3A wurde die Bildung des Konjugats des radioaktiv markierten AIR-3A mit H-IL-6 nahezu komplett inhibiert. 1000-facher Überschuss einer nicht an H-IL-6 bindenden RNA hatte keinen Einfluss auf des Bildung des kovalenten Konjugates. B) Die Bildung eines im SDS-Gel stabilen Komplexes von AIR-3A und H-IL-6 erfolgte nur, wenn die AIR-3A und H-IL-6 enthaltende Lösung der UV-Behandlung unterzogen wurde. PL: Prest. Protein-Ladder, nachträglich radioaktiv angefärbt.

Für die in den folgenden Abschnitten durchgeführten Fragmentierungen der Experimente zur Analyse der am XL beteiligten Nukleotide bzw. Peptide wurde das XL-Produkt aus AIR-3A

## ERGEBNISSE

und Hyper-IL-6 verschiedenen Behandlungen unterzogen. Es wurde so sichergestellt, dass die XL-Bindung unter den Arbeitsschritten der Fragmentierungen stabil war. Abbildung 42 zeigt die Analyse des UV-XL-Produktes nach basischer Behandlung ( $\text{OH}^-$ ; entsprechend den Reaktionsbedingungen zur partiellen alkalischen Hydrolyse von RNA, siehe Abschnitt 4.4.4.1), leicht saurer Behandlung ( $\text{H}^+$ ; entsprechend den Reaktionsbedingungen zur RNA-Fragmentierung mit RNase-T1, siehe Abschnitt 4.4.4.2), Behandlung mit Imidazol (entspricht der RNA-Fragmentierung mit Imidazol, siehe Abschnitt 4.4.4.4) sowie der Behandlung mit DTT (entspricht der Denaturierung für die Proteinfragmentierung mit Trypsin, siehe Abschnitt 5.5.3). Nach allen Behandlungen außer der basischen Behandlung konnte die Bande des UV-XL-Produktes (ca. 75 kDa) autoradiographisch und das Protein durch Silberfärbung in einem 10%igen SDS-Gel nachgewiesen werden. Unter basischen Bedingungen scheint das Protein Hyper-IL-6 hydrolysiert zu werden bzw. höhere Konjugate zu bilden (> 170 kDa; Abbildung 42B).



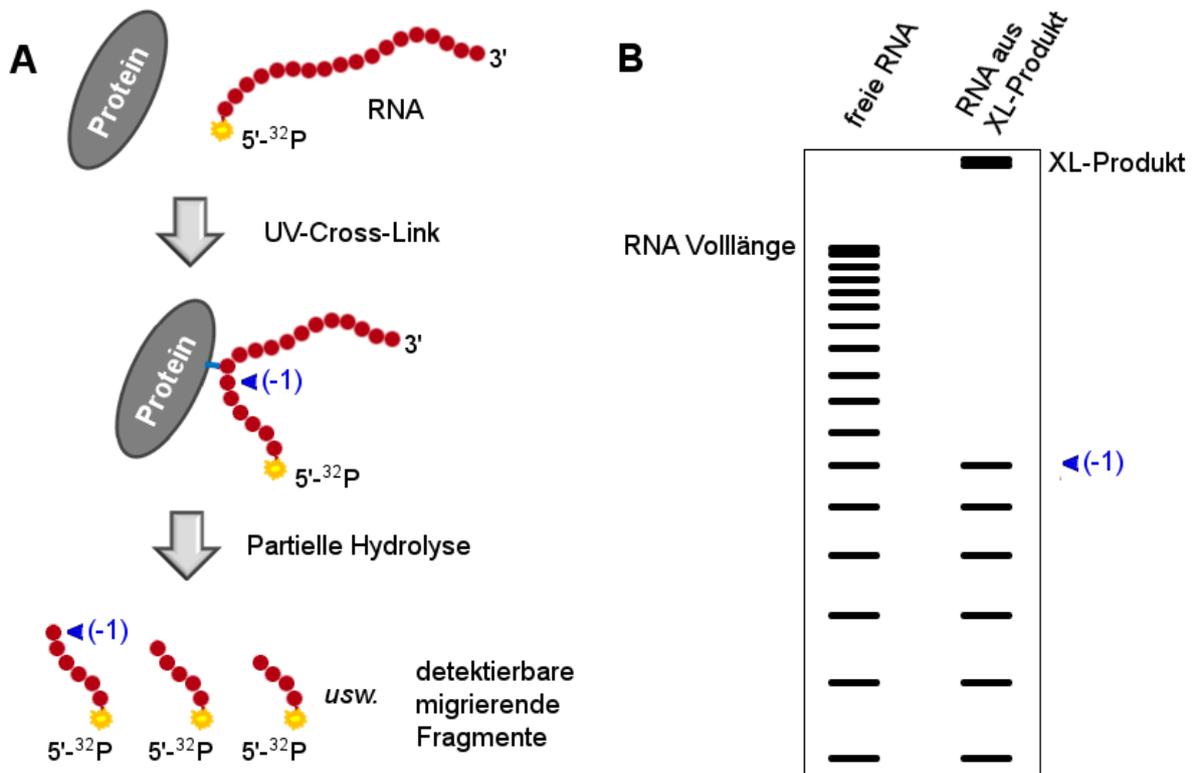
**Abbildung 42: Stabilität des UV-XL-Produktes von AIR-3A und Hyper-IL-6 unter verschiedenen Bedingungen.** A) Autoradiographische Detektion. B) Detektion nach Silberfärbung. PL: Prest. Protein-Ladder, nachträglich radioaktiv angefärbt. Aufgetragen wurden Aliquots eines UV-XL-Experimentes von AIR-3A mit Hyper-IL-6 (H-IL-6): ohne weitere Behandlung (unb.), nach basischer Behandlung ( $\text{OH}^-$ ; 15 min, 90 °C, pH 9,5), nach leicht saurer Behandlung ( $\text{H}^+$ ; 2 min, 60 °C, pH 5,0), nach Behandlung mit Imidazol (Imd.; 10 min, 90 °C, 2 M Imidazol, pH 7,0), Behandlung mit DTT (DTT; 2 min, 75 °C, 100 mM DTT). PL: Prest. Protein-Ladder, nachträglich radioaktiv angefärbt.

### 5.5.2 Fragmentierung der RNA des XL-Produktes mittels RNase A und Imidazol

Zur Identifikation der an der XL-Bindung beteiligten Nukleotide wurde das UV-XL-Produkt von AIR-3A auf verschiedene Arten fragmentiert. Eine etablierte Methode hierfür ist die Fragmentierung der RNA eines XL-Produktes durch partielle alkalische Hydrolyse [208, 257]. Dabei wird die terminal radioaktiv markierte RNA in freier Form und in Form des gereinigten XL-Produktes partiell hydrolysiert, anschließend in einem Sequenziergel getrennt und

## ERGEBNISSE

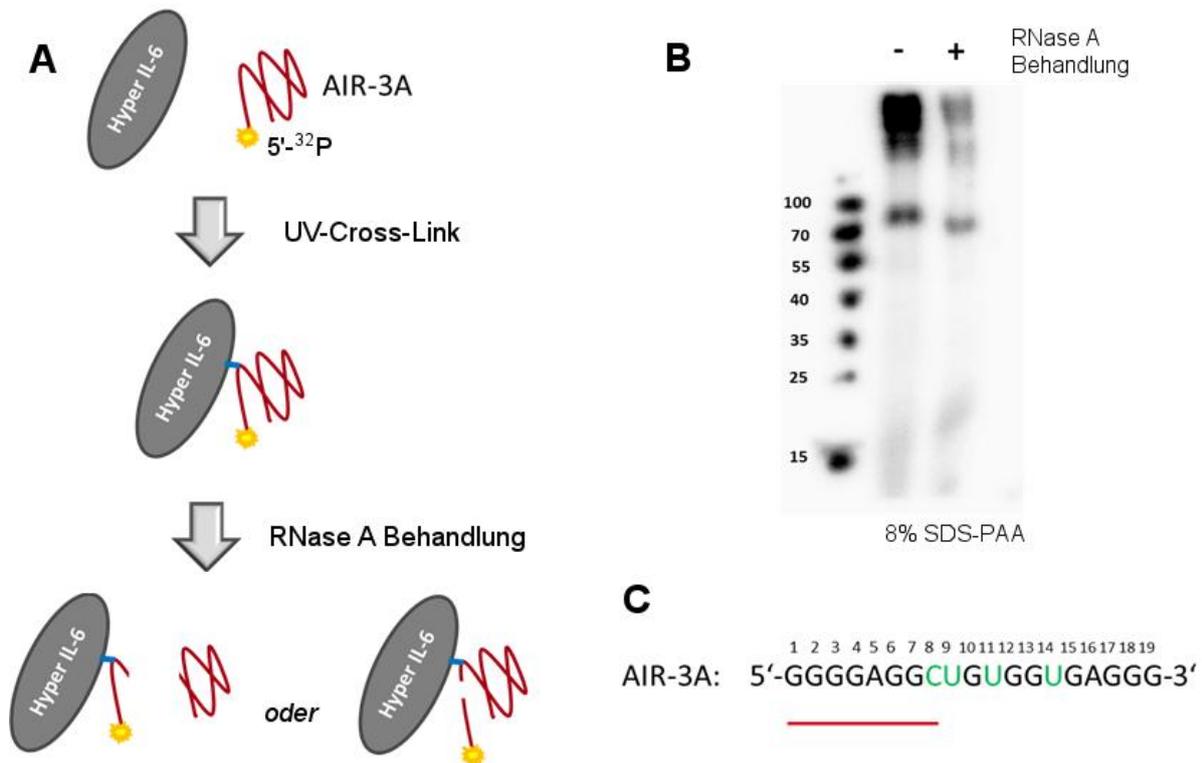
autoradiographisch analysiert. Während für die freie RNA das Bandenmuster aller Einzelfragmente erhalten wird (genauer: alle Fragmente, die den markierten Terminus enthalten), erscheint für die RNA aus einem XL-Produkt nur das Bandenmuster für Fragmente, die 5'-terminal der XL-Bindung liegen, da Fragmente, die das Protein tragen, nicht oder nur sehr gering im Sequenziergel wandern (Abbildung 43).



**Abbildung 43 Prinzip der Positionsermittlung der XL-Bindung durch partielle Hydrolyse der RNA.** A) Nach der kovalenten Verknüpfung der 5'-terminal radioaktiv markierten RNA mit dem Zielprotein und anschließender Reinigung des XL-Produktes, wird die verknüpfte RNA partiell hydrolysiert (z.B. alkalisch). Von den entstehenden RNA-Fragmenten können nur solche mit intaktem 5'-Terminus und einer Länge bis zu einem Nucleotid vor der XL-Bindung (-1) im anschließenden RNA-Sequenziergel nachgewiesen werden (B).

Das UV-XL-Produkt von Hyper-IL-6 und AIR-3A erwies sich als nicht geeignet für die Fragmentierung durch partielle alkalische Hydrolyse. Nach der alkalischen Behandlung wurden für das XL-Produkt identische Bandenmuster erhalten wie für die freie RNA. Nach Abbildung 42 kann dies auf die Hydrolyse des Proteins zurückzuführen sein. Ebenso denkbar ist, dass die durch das *cross linking* generierten Bindungen alkalilabil waren. Die Fragmentierung der RNA wurde daher enzymatisch mit RNase A durchgeführt. Nach Inkubation des XL-Produktes mit einem Überschuss von RNase A (ca. 0,1 µg Enzym pro pmol Aptamermolekül) für 20 min bei 37 °C erfolgte eine Zunahme der elektrophoretischen Mobilität des XL-Produktes in einer anschließenden SDS-PAA-Gelelektrophorese (Abbildung 44B). Zudem nahm durch die RNase A-Behandlung die Stoffmenge an autoradiographisch detektierbarem XL-Produkt auf  $48,0 \pm 12,6\%$  der unbehandelten Stoffmenge ab.

## ERGEBNISSE

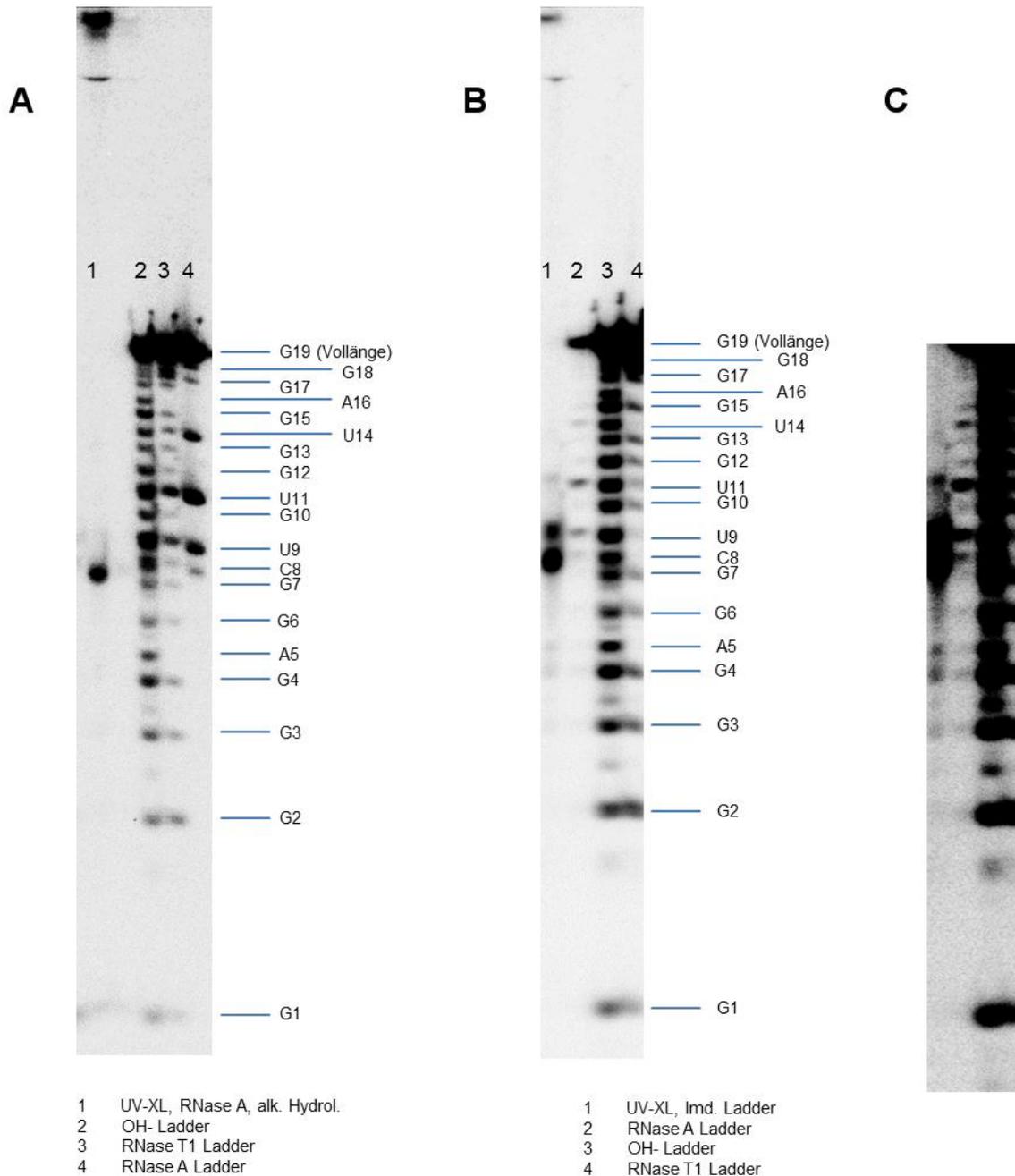


**Abbildung 44: Analyse des UV-XL-Produktes von AIR-3A und Hyper-IL-6 vor und nach Behandlung mit RNase A.** A) Nach dem XL-Experiment mit 5'-terminal markiertem AIR-3A wurden 50% des Reaktionsansatzes mit RNase A behandelt (0,1 µg/pmol RNA; 20 min bei 37 °C). Durch die ribonukleolytische Spaltung entstanden Fragmente des XL-Produktes mit intaktem 5'-Terminus als auch Fragmente mit abgespaltenem 5'-Terminus. B) Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Analyse des XL-Produktes vor und nach RNase A-Behandlung (8%-SDS-PAA-Gel, Glycin gepuffert). C) Sequenz von AIR-3A. grün: 3'-terminal mit RNase A spaltbare Nucleotide. rot markiert: aus dem XL-Produkt verbleibendes detektierbares Fragment (G1-C8).

Daraus folgt, dass etwa die Hälfte aller kovalent gebundenen RNA-Moleküle durch eine Bindung innerhalb der ersten acht oder neun Nucleotide mit Hyper-IL-6 verknüpft war (5'-terminal der mit RNase A spaltbaren Nucleotide, in Abbildung 44C grün markiert). Gemäß Abbildung 44A war die übrige andere Hälfte der Aptamermoleküle ausschließlich über Nucleotide verknüpft, welche mit RNase A vom markierten 5'-Terminus getrennt werden konnten.

Um zu klären, ob Position C8 in AIR-3A ein durch UV-cross-linking verknüpfbares Nucleotid darstellte, wurde das mit RNase A fragmentierte XL-Produkt anschließend in einem RNA-Sequenziergel analysiert (Abbildung 45A). Hierfür wurde die zuvor gewonnene Erkenntnis genutzt, durch alkalische Hydrolyse aus dem XL-Produkt wieder die freie RNA gewinnen zu können. Die Hydrolyse wurde hierbei unter Bedingungen durchgeführt, bei denen keine wesentliche RNA-Fragmentierung stattfindet. Das entsprechend behandelte XL-Produkt lieferte als autoradiographisch detektierbares Produkt ausschließlich die Verkürzung G1-C8 von AIR-3A. Damit konnte C8 als XL-Bindungsstelle ausgeschlossen werden. Es erfolgte daher eine XL-Bindung aus einem der ersten sieben Nucleotide.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 45: Analyse der Fragmentierungen des UV-XL-Produktes mittels RNA-Sequenziergelen.** A) Analyse nach Fragmentierung mit RNase A. B) Analyse nach Fragmentierung mit Imidazol. C) Kontrastverstärkter Ausschnitt aus der Analyse der Imidazol-Fragmentierung (B). Sichtbar sind hier die Banden kürzerer Fragmente. Für alle Abbildungen wurden die Fragmentierungsansätze auf 17,5%igen PAA-Gelen (8 M Harnstoff) elektrophoretisch getrennt.

Als weitere Analysemethode wurde die Fragmentierung von AIR-3A aus dem XL-Produkt durch Inkubation mit Imidazol durchgeführt, welche eine Alternative zur oben beschriebenen partiellen alkalischen Hydrolyse darstellt (siehe Abschnitt 4.4.4.4). In der Analyse konnten in einem RNA-Sequenziergel deutliche Fragmentbanden für Position C8 und U9, sowie schwächere Banden der anderen Nukleotide von Position G3 bis U11 detektiert werden (Abbildung 45B & C). Die am oberen Ende der Sequenziergele detektierten Banden sind den unfragmentierten XL-Produkten zuzuordnen. Dies beweist, dass die XL-Produkte nur partiell

fragmentiert wurden und es sich bei den detektierten Banden um primäre Fragmente handelt.

### 5.5.3 Massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide des XL-Produktes

Zur Analyse der an der UV-XL-Bindung beteiligten Sequenzabschnitte des Proteins wurden massenspektrometrische Analysen von mit Trypsin verdauten Proben des reinen Proteins und des UV-XL-Produktes durchgeführt. Hierfür wurde Hyper-IL-6 mit AIR-3A durch UV-Bestrahlung kovalent verknüpft, das reine Protein und das UV-XL-Produkt gelgereinigt, mit Trypsin verdaut und in mehreren Messungen massenspektrometrisch analysiert (siehe Abschnitt 4.4.4). Der Verdau mit Trypsin sowie die Aufnahme der Massenspektren wurde von Herrn M.Sc. Marcel Kwiatkowski (AG Prof. Dr. Schlüter) durchgeführt. Es konnte aufgrund der hohen Masse von AIR-3A (ca. 6,3 kDa) und der mehrfachen negativen Ladung von AIR-3A erwartet werden, dass Peptide, welche kovalent gebundenes AIR-3A trugen, nicht in der verwendeten MS-Methode detektiert wurden (MALDI-TOF-MS mit Hydroxybenzoesäure-Matrix). Die erhaltenen Spektren von Hyper-IL-6 und dem UV-XL-Produkt wurden verglichen und bezüglich der für Hyper-IL-6 erwarteten tryptischen Peptide untersucht (Abbildung 46A). Fehlende Peptidsignale im Spektrum des UV-XL-Produktes stellten mögliche Sequenzbereiche der UV-XL-Bindung dar (Abbildung 46B und C). In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Analyse des Peptidmassen Fingerprints von sechs Messungen für das reine Protein Hyper-IL-6 und vier Messungen des UV-XL-Produktes wiedergegeben. Die datenbankbasierte Peptididentifikation mit der Software *Mascot* [258] ergab bereits eine Abdeckung von 52% für das reine Protein und 37% für das UV-XL-Produkt sowie die Identifikation von hIL-6R und hIL-6, aus denen Hyper-IL-6 zusammengesetzt ist, mittels der *SwissProt*-Datenbank. Durch weitere manuelle Analyse betrug die Abdeckung im relevanten Proteinbereich (Domänen D1 und D2, AS 20-215) 79%. Lediglich der Abschnitt 33-63 konnte nicht abgedeckt werden. Dies kann dadurch bedingt sein, dass dieser Sequenzbereich nach Behandlung mit Trypsin als ein einzelnes Peptid mit relativ hoher Masse ( $m/z \geq 3384$ ) vorliegen müsste, welches der Analyse im MS schlecht zugänglich wäre.

## ERGEBNISSE

Zu zwei tryptischen Peptiden konnten in keiner der Messungen des UV-XL-Produktes Signale gefunden werden. In den Messungen des reinen Proteins lieferten diese Peptide jeweils eindeutige Signale. Bei diesen Peptiden handelt es sich um:

- 1) 85-98 (AS-Nummerierung inkl. des 19AS-Signalpeptids)
- 2) 102-123 (AS-Nummerierung inkl. des 19AS-Signalpeptids)

Diese beiden Sequenzbereiche stellen damit wahrscheinliche Bindungsstellenbereiche von AIR-3A an Hyper-IL-6 dar. Zudem wurden für zwei weitere tryptische Peptide, die mit Peptid 2 überlappen, keine eindeutigen Signale gefunden (Masse lediglich in einer der vier Messungen gefunden). Dies stellt einen zusätzlichen Hinweis auf das Vorliegen einer XL-Bindung im Bereich von Peptid 102-123 dar.

**Tabelle 21: Ergebnisse der Peptid-Identifikation (Fingerprint-Analyse) aus den massenspektrometrischen Analysen tryptischer Peptide von reinem Hyper-IL-6 und dem UV-XL-Produkt von AIR-3A und Hyper-IL-6.**

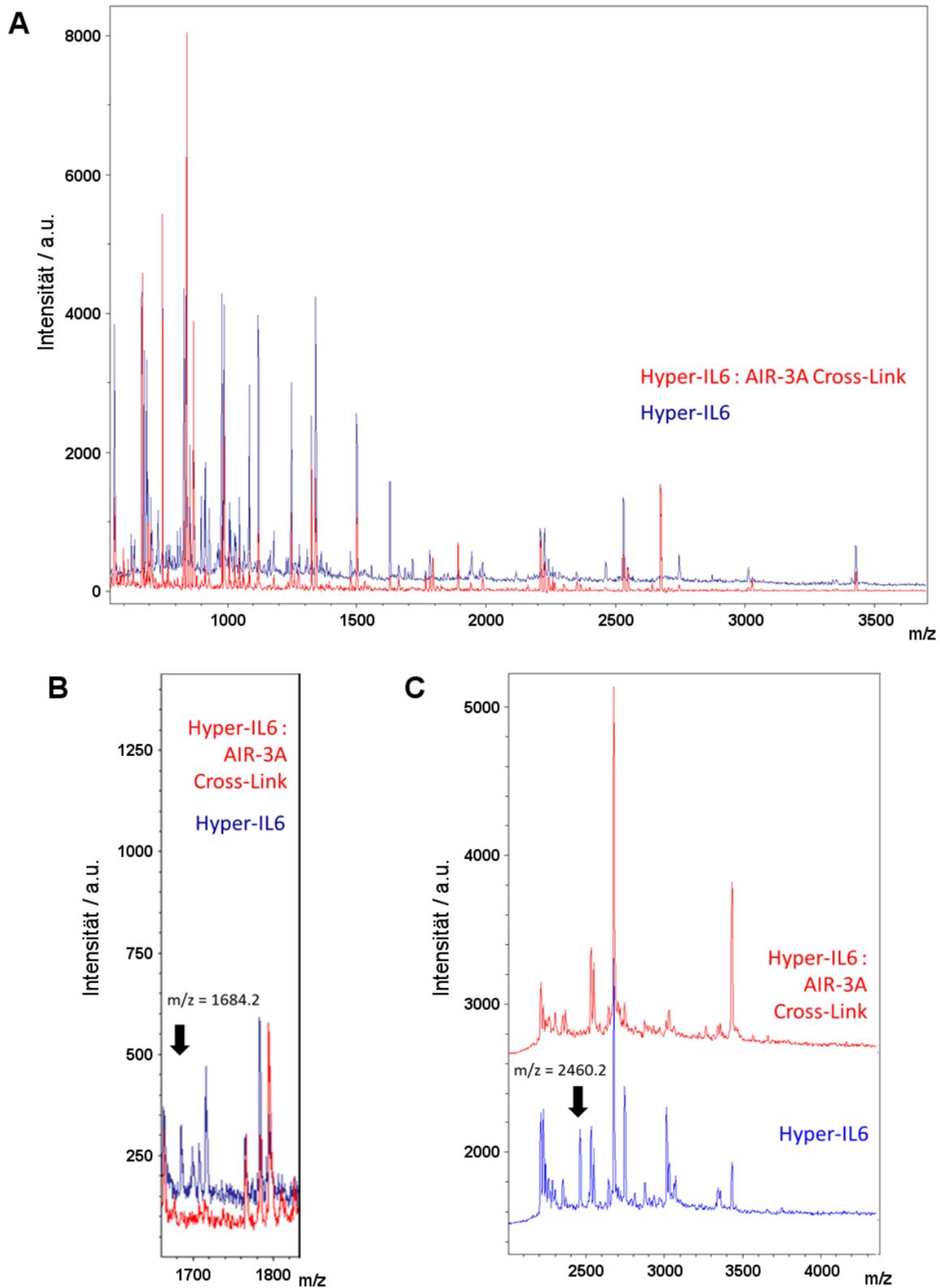
Die experimentell ermittelten Peptidmassen [Masse (gefunden)] stellen einfach protonierte Spezies dar (m+1). Angegeben sind die Ergebnisse aus der Peptidmassen-Fingerprint-Analyse mittels Datenbanksuche [259] sowie manuelle Analyse. Aus der manuellen Analyse sind nur Peptide aufgeführt, die in mindestens drei Messungen gefunden wurden – mit Ausnahme der tryptischen Peptide 99-103 und 99-124, die nur in einer von vier Messungen eindeutige Signale lieferten. In den Peptidsequenzen sind die Positionen der Spaltung durch Trypsin durch einen Punkt angegeben. Rot unterlegt sind die Peptide die mutmaßliche UV-XL-Bindungen enthalten.

Start- Ende*	Masse (monoiso.) **	Masse (Ø)**	Peptidsequenz	Hyper-IL-6	XL-Produkt
				Masse (gefunden)	Masse (gefunden)
1-23	2207,1863	2206,2330	MLAVGCALLAALLAAPGAALAPR.R + Ox. (M)	2208,1936	2208,1899
24-32	1085,1018	1085,5400	R.RCPAQEVAR.G	1086,1091	1086,3205
25-32	929,0593	929,4389	R.CPAQEVAR.G	930,0666	930,0542
74-79	676,0542	676,3115	R.WAGMGR.R	677,0614	677,1860
74-79	692,0474	692,3064	R.WAGMGR.R + Ox. (M)	693,0547	693,1590
74-80	832,1604	832,4126	R.WAGMGRR.L	833,1677	833,3015
81-84	513,1868	513,3638	R.LLLR.S	514,1941	514,2423
85-98	1684,1686	1684,7264	R.SVQLHDSGNYSYR.A	1685,1759	nicht präsent
99-123	2743,2548	2744,4068	R.AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFR.K	2744,4068	2746,239(?)
99-124	2871,3530	2872,5018	R.AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRK.S	2872,5018	2873,938(?)
102-123	2460,3307	2460,2371	R.PAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFR.K	2461,3380	nicht präsent
124-137	1627,2069	1627,8141	R.KSPLSNVVCEWGPR.S	1628,2142	1628,4923
125-137	1499,1612	1499,7191	K.SPLSNVVCEWGPR.S	1500,1685	1500,3995
138-145	833,4390	833,9200	R.STPSLTTK.A	834,4340	834,4000
146-151	669,2152	669,4537	K.AVLLVR.K	670,2225	670,3055
152-173	2673,0978	2674,1605	R.KFQNSPAEDFQEPQYQSQK.F	2674,1050	2674,3534
153-173	2545,1813	2546,0656	K.FQNSPAEDFQEPQYQSQK.F	2546,1886	2546,3144
174-201	3011,6857	3011,3170	K.FSQCLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSK.F	3012,6930	3011,2347
202-229	3016,5450	3018,3999	K.FSKTQTFQCGILQPDPANITVTAVAR.N	3018,1070	3017,9431

\* angegeben sind die AS-Positionen inklusive des N-terminalen 19-AS Signalpeptids

\*\* Cystein-Reste wurden gemäß der Behandlung mit Iodacetamid als alkyliert berechnet. (+ 57,033 Da durch Carboxyamidomethyl-Modifikation)

ERGEBNISSE



**Abbildung 46: Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide von reinem Hyper-IL-6 und dem UV-XL-Produkt von AIR-3A und Hyper-IL-6.** A) Vergleich der Gesamtspektren des reinen Proteins (blau) und des UV-XL-Produktes (rot). B) und C) Vergrößerungen der Spektrenabschnitte mit den Peptidsignalen, welche nur in den Spektren des reinen Proteins gefunden wurden und daher mögliche Sequenzabschnitte mit Beteiligung an der XL-Bindung darstellen.  $m/z = 1684,2$  konnte dem Peptid mit dem AS-Bereich 85-98 aus dem rekombinanten Protein zugeordnet werden.  $m/z = 2460,2$  konnte dem Peptid mit dem AS-Bereich 102-123 aus dem rekombinanten Protein zugeordnet werden.

## 6 DISKUSSION

Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA Oligonukleotide (typischerweise mit einer Länge von 20-70 nt), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung Zielmoleküle mit hoher Spezifität und Affinität binden können. Das Spektrum der Zielmoleküle von Aptameren umfasst diverse Molekülklassen, von Atom-Ionen über niedermolekulare Moleküle bis hin zu Proteinen. Die Wechselwirkung mit dem Zielmolekül (mit Bindungsstärken bis zu  $K_d = 10^{-12}$  M) ergibt sich aus einer Kombination von elektrostatischen Anziehungen, Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ - oder Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen und van der Waals-Wechselwirkungen. Die Identifikation [248, 250] und Vorhersage [260] von Interaktionsflächen dient dem besseren Verständnis von Nukleinsäurebindungen allgemein sowie der weiteren Entwicklung des Selektionsprozesses von Aptameren (SELEX) und ist Gegenstand aktueller Studien [261]. Ein Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich daher diesem Thema in Form der Interaktionsanalyse des RNA-Aptamers AIR-3A mit dem humanen Interleukin-6 Rezeptor (hIL-6R).

Ein Anwendungsgebiet für Aptamere ist der aktive Wirkstofftransport. Aptamere, deren Zielmolekül ein internalisierbares Zelloberflächenprotein ist, können genutzt werden, um Therapeutika in das Zellinnere zu befördern. Für eine Reihe von publizierten Aptameren sind solche Wirkstofftransporte bereits beschrieben worden [7]. Die Klassen eingeschleuster Therapeutika umfassen kleinere organische Moleküle ( $m < 1$  kDa) wie Anthracycline oder Photosensibilisatoren, regulative RNAs (siRNAs oder miRNAs), zytotoxische Proteine (z. B. Gelonin) oder Nanopartikelkonjugate. Durch aptamervermittelten Transport ist es möglich, die Wirkung des Therapeutikums auf maligne oder krankheitsbedingt überrepräsentierte Zellen zu beschränken. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Aptamere für den Wirkstofftransport in Karzinomzellen genutzt werden können. Unter Verwendung von Xenograft-Modellen wurde die Wirksamkeit verschiedener Aptamer-Konjugate von anti-Tumor-Wirkstoffen [91] sowie siRNAs gegen tumorspezifische Gene [76, 109] bereits *in vivo* nachgewiesen.

Bei hIL-6R handelt es sich um die hIL-6 bindende Rezeptoreinheit eines Rezeptorkomplexes, welcher im Zusammenhang mehrerer Krankheitsbilder eine Rolle spielt. Dies sind vor allem Erkrankungen die auf chronische Entzündungsreaktionen zurückgehen, wie Rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn. Zudem konnte eine Korrelation zwischen der Dysregulation von hIL-6 und hIL-6R einerseits und der Entstehung von Myelomen und Karzinomen andererseits nachgewiesen werden [262]. AIR-3 ist ein 106 nt RNA-Aptamer, welches spezifisch den extrazellulären Teil des hIL-6R bindet. AIR-3A ist eine Verkürzung von AIR-3 und umfasst lediglich den Sequenzbereich des minimalen Bindemotivs (19 nt). In früheren Arbeiten wurden AIR-3 und AIR-3A bereits charakterisiert und deren Bindung an

hIL-6R auf der Zelloberfläche, sowie die Internalisierung von AIR-3A in hIL-6R positive Zellen der Zelllinie BaF3 beschrieben [8, 167-169]. Ziel dieser Arbeit war es, die RNA-Aptamere AIR-3 und AIR-3A für den gerichteten Wirkstofftransport in hIL-6R positive Zellen zu nutzen.

### 6.1 Bindung von AIR-3A auf der Zelloberfläche und dessen Internalisierung

Die Anzahl gebundener Aptamermoleküle pro Zelle konnte durchflusszytometrisch bestimmt werden. Danach binden maximal ca. 11.000 Moleküle des Alexa647-markierten Aptamers AIR-3A an eine Zelle der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ . Unter der Annahme von einem Aptamer pro Rezeptormolekül übertrifft damit die Anzahl an hIL-6R-Molekülen auf der Zelloberfläche von BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$  die der meisten humanen Zelllinien bei weitem. In der Studie von Taga *et al.* wurde die Anzahl von hIL-6R auf der Oberfläche diverser humaner Zelllinien mittels radioaktiv markiertem hIL-6 quantifiziert [263]. Danach wurden auf der Oberfläche von normalen T- und B-Lymphozyten bis zu 570 bzw. bis zu 990 Rezeptormoleküle gefunden. Für B-Lymphozyten wurden signifikante Rezeptorzahlen (> 30 Moleküle/Zelle) erst nach dreitägiger Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Stamm Cowan I (SAC) und nur in vergrößerten B-Zellen detektiert. Daraus wurde abgeleitet, dass es in B-Lymphozyten erst zu erhöhter Produktion und Präsentation von hIL-6R kommt, wenn diese das finale Reifestadium erreicht haben und durch Antigene aktiviert wurden. Für die von Taga *et al.* untersuchte Lymphom Zelllinie U-266 wurden hingegen bis zu 11.000 Moleküle des hIL-6R auf ihrer Oberfläche detektiert. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Aus den durchflusszytometrischen Analysen dieser Zelllinie wurden mittels Antikörper-Detektion nur etwa 8% der Mengen an hIL-6R auf U-266-Zellen gefunden wie auf der Zelllinie BaF3\_gp130\_hIL6R\_TNF $\alpha$ , dies entspräche weniger als 1.000 Rezeptormolekülen pro Zelle.

Des Weiteren wurden die humanen Zelllinien RPMI-8226, KMS-12-BM, U937, EJM, LNCap, PC3 und LAN-1 auf ihre Expression des hIL-6R untersucht. Für alle Zelllinien konnte hIL-6R mittels Antikörper-Detektion durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Die höchste Anzahl an hIL-6R wurde dabei für die Zelllinie KMS-12-BM gefunden, allerdings nur mit einer Signalstärke, die etwa 28% der Rezeptoranzahl auf hIL-6R positiven BaF3-Zellen entspräche. Von den untersuchten Zelllinien war KMS-12-BM die einzige, für die eindeutig eine spezifische Bindung von AIR-3A nachgewiesen werden konnte. Es wurde jedoch auch eine geringfügige (unspezifische) Bindung der nicht an hIL-6R bindenden Kontroll-RNA (AIR-3A\_G17U) an diese Zellen festgestellt. Für weitere der oben genannten Zelllinien wurden leichte unspezifische RNA-Bindungen registriert. Daher wäre es für die folgenden Forschungen zur Anwendung von AIR-3A an humanen Zelllinien ratsam, zu untersuchen, ob durch geeignete Stimulation (siehe vorheriger Absatz) die Anzahl von hIL-6R-Einheiten und

## DISKUSSION

damit der Anteil spezifisch gebundener Aptamermoleküle auf humanen Zellen erhöht werden kann.

Die Endozytose des an hIL-6R gebundenen AIR-3A ist bereits in früheren Arbeiten für hIL6R positive BaF3-Zellen beschrieben worden [169]. Für die Anwendung des Aptamers AIR-3A als Transportvehikel für Therapeutika, wurde das Schicksal des endozytierten Aptamers genauer untersucht. Hierbei galt es zu klären, welche Sublokalisierung der Rezeptor und mit ihm das Aptamer in der Zelle erfährt. Aus Co-Lokalisationsstudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (kLSM) konnte AIR-3A zu geringen Teilen im frühen Endosom der Zellen lokalisiert werden. Diese Aufnahmen wurden an fixierten Zellen mittels immunhistochemischer Färbung des Frühen-Endosom-Antigens 1 durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass in Abhängigkeit der bei der Fixierungsmethode eingesetzten Lösungsmittel (Methanol, Ethanol oder Formaldehyd-Lösungen) unterschiedliche Muster der Signalverteilung von AIR-3A erhalten wurden. Da es sich bei AIR-3A um ein vergleichsweise kleines Molekül handelt und seine Bindung an den hIL-6R nach der Internalisierung bzw. sein Abbau ungewiss sind, kann es durch die Behandlung mit Fixierungslösungen zu Veränderungen der subzellulären Verteilung von AIR-3A bzw. des Fluoreszenzmarkers von AIR-3A (Atto647N) kommen. Dieses Problem der Fluoreszenzmikroskopie von fixierten Zellen kann durch die Verwendung von fluoreszenten Reporterproteinen wie GFP [264] oder durch Färbung mit kompartimentspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen in lebenden Zellen umgangen werden [265, 266]. Die Co-Lokalisation mit dem späten Endosom bzw. Lysosom erfolgten in lebenden BaF3-Zellen mittels eines pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs. Die kLSM-Aufnahmen zeigten für die Fluoreszenzsignale von AIR-3A größtenteils übereinstimmende Bereiche mit dem Marker des späten Endosoms/Lysosoms. Daher wird angenommen, dass hIL-6R in BaF3-Zellen nach der Internalisierung und entsprechender Prozessierung dem lysosomalen Abbau unterliegt.

Viele Rezeptoren der Tyrosin-Kinase-Klasse durchlaufen nach erfolgter Endozytose eine Sortierung im frühen Endosom [267]. Ein Teil wird anschließend an die Zelloberfläche zurückgeführt ( $t_{1/2} \approx 2,5$  min) während insbesondere Rezeptoreinheiten mit gebundenem Liganden in das späte Endosom (sog. multivesikuläre Körper) prozessiert werden, um dem Abbau im Lysosom zugeführt zu werden [68, 268]. Es ist bereits bekannt, dass hIL-6R in Anwesenheit von hIL-6 in Hepatozyten nach erfolgter Endozytose zu 80% lysosomal degradiert wird [269]. Dies stellt einen Regulationsmechanismus dar, mit dem der Stimulation durch hIL-6 entgegengewirkt wird.

Inwiefern AIR-3A die Endozytose des Rezeptors oder dessen Prozessierung innerhalb der Zelle beeinträchtigt, konnte nicht vollständig geklärt werden. Es konnte jedoch eine mutmaßliche Regenerationszeit der Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche ermittelt

## DISKUSSION

werden. Diese wurde in Form der Zeit bestimmt, die von BaF3-Zellen benötigt wurde, um ein maximales Bindepotential für AIR-3A wiederzugewinnen. Hierfür wurden die Rezeptormoleküle der Zelloberfläche auf Eis mit AIR-3A abgesättigt und die Zellen anschließend in hIL-6-haltigem Vollmedium kultiviert. Direkt im Anschluss an eine Absättigung konnten von den Zellen keine weiteren Aptamereinheiten gebunden werden. Innerhalb der Zeitspanne von drei Stunden nach dieser Absättigung stieg das Bindepotential für AIR-3A kontinuierlich an und erreichte im Zeitraum zwischen drei und fünf Stunden nach der Absättigung ein Plateau. Die relative Menge des fluoreszenzmarkierten Aptamers wurde dabei durchflusszytometrisch detektiert. Nach etwa drei Stunden wurden Fluoreszenzintensitäten gemessen, die in etwa der doppelten Menge an Aptamer gegenüber einfach abgesättigten Zellen entsprachen. Daher wird davon ausgegangen, dass nach drei Stunden für die Zelllinie BaF3\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  die maximale Regeneration des hIL-6R an der Zelloberfläche erfolgte. Die Regeneration kann in Folge von Rezeptor-Recycling als auch durch neu in den Zellen produzierte Rezeptormoleküle erfolgt sein. Zweites wird als wahrscheinlicher angesehen. Diese Annahme begründet sich durch zwei Beobachtungen. Erstens wurde ein Akkumulieren der Fluoreszenzintensität durch wiederholtes Inkubieren mit fluoreszenzmarkiertem Aptamer beobachtet. Dies spräche zumindest gegen ein direktes Recycling des Rezeptors mit gebundenem Aptamer. Zweitens kann aus den Ergebnissen der Co-Lokalisationsstudien ein lysosomaler Abbau des Rezeptors angenommen werden. Abschließend konnte mit diesen Experimenten auch gezeigt werden, dass AIR-3A weitestgehend geschützt gegen den Abbau durch RNasen im Zellkulturmedium ist, wenn es bereits an hIL-6R auf der Zelloberfläche gebunden hat. Dies kann aus dem Erhalt der Fluoreszenzintensität von an den Zellen gebundenem AIR-3A während der Rezeptorregeneration in Vollmedium geschlossen werden. Da es sich bei den RNasen im Zellkulturmedium hauptsächlich um solche der RNase A-Familie aus dem fötalen Kälberserum handelt, kann diese Beobachtung als Bestätigung der Ergebnisse von Dr. K. Eydelor betrachtet werden, wonach AIR-3A nach Bindung an hIL-6R auf der Zelloberfläche nicht mit RNase A spaltbar ist [169].

Es wurden zudem Hinweise für den Mechanismus gefunden, nach welchem die Endozytose von hIL-6R mit gebundenem AIR-3A verläuft. Endozytose erfolgt durch vielfältige Mechanismen, die in die Gruppe der Clathrin-abhängigen und der Clathrin-unabhängigen Formen unterteilt werden können [270]. Clathrin-abhängige Endozytose beinhaltet die Erkennung der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran durch Adapterproteine, welche zur Verpackung und zum Abschnüren von Clathrin-umhüllten Vesikeln führt. Prominente Beispiele Clathrin-abhängig endozytierter Rezeptoren sind der Transferrin-Rezeptor und LDL-Rezeptoren [271]. Wichtige Formen Clathrin-unabhängiger Endozytose sind die Caveolin-vermittelte Endozytose, die Macropinozytose und die Phagozytose. Um zu klären,

ob eine bestimmte Endozytoseform maßgeblich an den Internalisierungsvorgängen von AIR-3A in BaF3-Zellen beteiligt ist, wurden im Rahmen der Betreuung der Bachelorarbeit von Lisa Prisner drei Inhibitoren verwendet, die jeweils unterschiedliche Endozytoseformen inhibieren [272]. Keinen signifikanten Einfluss auf die Endozytose hatte danach Dynasore, welches als GTPase-Inhibitor die Aktivität von Dynaminen hemmt [273]. Dynamine verhindern unter anderem das Abschnüren der Clathrin-umhüllten Vesikel in der Clathrin-vermittelten Endozytose. Ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Endozytose hatte Cytochalasin D, ein Inhibitor der Actinpolymerisation [274]. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Actin-Zytoskelett nicht entscheidend an der Endozytose beteiligt ist. Dagegen wurde die Endozytose komplett unterbunden durch vorherige Behandlung der Zellen mit Amilorid, einem Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausches [275]. Dies spräche für einen Endozytosemechanismus der Macropinozytose, welche am stärksten mit  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch korreliert ist. Auffällig war jedoch auch, dass Amilorid auch die Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche konzentrationsabhängig um bis zu 90% reduzierte. Aufgrund dessen kann nicht mit Sicherheit für eine macropinozytotische Endozytose argumentiert werden. Da viele Rezeptoren durch verschiedene Mechanismen endozytiert werden, wäre es denkbar, dass dies auch auf hIL-6R in BaF3-Zellen zutrifft [270].

### 6.2 Wirkstofftransport durch AIR-3A und AIR-3

Für den Wirkstofftransport mit AIR-3A wurden zunächst siRNAs und das Toxin Gelonin als Transportladung ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Es wurden zum einen siRNAs, die gegen die Polo-Like-Kinase 1 (PLK1) gerichtet waren, mit AIR-3A in Form von monomolekularen Chimären (siehe Abschnitt 1.1.3) verwendet und ihre Wirkung auf hIL-6R positive BaF3-Zellen untersucht. PLK1 ist ein wichtiger Regulator verschiedener Abschnitte der Mitose. So ist sie beispielsweise maßgeblich am Übergang von der G2-Phase in die M-Phase beteiligt, indem sie auf mehreren Ebenen die Aktivierung und Translokation von CDK1-Cyclin B1 bewirkt. Dies macht die PLK1 zu einem Target in der Krebstherapie [276]. Für die hergestellten Chimären wurden sowohl publizierte siRNA-Sequenzen gegen die murine PLK1 verwendet [277], als auch solche, die mittels eines online verfügbaren *target finders* [278] ausgewählt wurden. Für die AIR-3A-siRNA-Chimären konnten aus Filterretentionsstudien spezifische Affinitäten für Hyper-IL-6 in der gleichen Größenordnung wie für AIR-3A ermittelt werden. Ebenso wurden die AIR-3A-siRNA-Chimären *in vitro* von dem Enzym Dicer prozessiert. Dennoch konnte kein Effekt auf zellulärer Ebene festgestellt werden (Western-Blot-Analyse der *plk1*-Expression und Bestimmung der Zellproliferation).

Für weitere Chimären mit siRNAs gegen den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNF-R1) wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. Diese Konstrukte wurden an der Zelllinie U-937

angewendet und die Expression des Rezeptors durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnten keine Veränderungen der Expression von TNF-R1 nach Behandlung der Zellen mit den Chimären festgestellt werden, obwohl auch für diese siRNA-Konstrukte die spezifische Bindung an Hyper-IL-6 und die Prozessierung durch Dicer nachgewiesen werden konnte.

Das Toxin Gelonin [279], welches zur Klasse der TypA ribosominaktivierenden Proteine gehört, konnte erfolgreich mittels eines SPDP-Linkers (über eine Amid- und eine Disulfidbindung) mit 5'-terminal amino-modifizierten AIR-3A gekoppelt werden. Es gelang jedoch nicht, das Konjugat von ungekoppeltem Protein zu trennen. Zellkulturexperimente des ungetriggerten Konjugates (ca. 30:70 Konjugat und freies Gelonin) mit hIL-6R positiven BaF3-Zellen lieferten keinen Hinweis auf einen spezifischen Transport von Gelonin über AIR-3A ins Zellinnere.

Wie schon in früheren Arbeiten [169, 280] konnten somit keine zellulären Veränderungen nach Behandlungen mit den Aptamer-Wirkstoff-Konjugaten von siRNAs und Gelonin beobachtet werden. Gründe hierfür können in einer zu geringen Aufnahme in die Zellen oder in der Prozessierung von hIL-6R in lysosomale Kompartimente der Zelle sein. Weder für die verwendeten siRNA-Chimären noch für das hergestellte Konjugat von Gelonin und AIR-3A wird angenommen, dass es die Möglichkeit besitzt, aktiv aus endosomalen Vesikeln in das Zytosol zu gelangen. Daher wird vermutet, dass diese biomolekularen Wirkstoffe nach Aufnahme in die Zellen lysosomal degradiert wurden und damit unwirksam blieben.

In der Konsequenz wurden daher Wirkstofftransporte für Stoffe etabliert, deren intrazelluläre Wirksamkeit nicht durch die Prozessierung in lysosomale Kompartimente beeinträchtigt sondern vielmehr begünstigt wird.

### 6.2.1 Aptamer vermittelte *in vitro*-PDT

Die photodynamische Therapie (PDT) nutzt das Zusammenspiel von photoaktivierbaren Stoffen (Photosensibilisator) und elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich zu deren Anregung. Als Folge kommt es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff und anderer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), durch die Zellschädigungen hervorgerufen werden können. Voraussetzung für die therapeutische Nutzbarkeit ist die Zugänglichkeit von Zielzellen (z. B. Tumorzellen) für beide PDT-Komponenten. Photosensibilisatoren bieten sich als Stoffklasse für den aptamervermittelten Wirkstofftransport an, da durch spezifische Internalisierung in Zielzellen die aufgenommene Wirkstoffmenge erhöht und die Nebenwirkungen der PDT auf andere Zellen vermindert werden können.

## DISKUSSION

Als erster Schritt wurde die Konjugation von 3'-terminal amino-modifiziertem AIR-3A mit dem Photosensibilisator Chlorin e6 durch EDC/NHS-vermittelte Amid-Kopplung etabliert. Das entstandene Konjugat konnte durch Fällungen mit Ethanol aus MES-gepufferter Lösung (pH 6) vollständig von freiem Chlorin e6 getrennt werden. Das erhaltene Produkt AIR-3A-ce6 zeigte vergleichbare spektrale Eigenschaften mit denen des freien Chlorin e6, so dass für AIR-3A-ce6 die gleiche Photoaktivität wie für das freie Chlorin e6 angenommen werden konnte. Ebenfalls konnte für AIR-3A-ce6 mittels Filterbindungsstudien die spezifische Bindung an Hyper-IL-6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vor den Zellkulturrexperimenten wurde eine geeignete negativ-Kontrolle hergestellt, das analoge Chlorin e6-Konjugat einer RNA mit identischer Basenzusammensetzung wie AIR-3A, aber mit unterschiedlicher Sequenz (*shuffled* AIR-3A).

Über die Eigenfluoreszenz von Chlorin e6 wurde die Bindung von AIR-3A-ce6 auf hIL-6R-positiven BaF3-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass AIR-3A-ce6 mit vergleichbarer Affinität wie Atto647N-markiertes AIR-3A spezifisch an hIL-6R-präsentierende Zellen bindet. Eine Sättigung von gebundenem AIR-3A-ce6 an BaF3\_gp130\_hIL-6R\_TNF $\alpha$  Zellen wurde bei einer Konzentration von 50 nM erreicht. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde für freies Chlorin e6 als auch für *shuffled* AIR-3A-ce6 keine Bindung an die Zellen registriert. Neben der Bindung wurde auch die Internalisierung von AIR-3A-ce6 nachgewiesen. Dafür wurden kLSM-Aufnahmen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz des Photosensibilisators nach Internalisierung in Form von AIR-3A-ce6 über das gesamte Zytosol der Zellen detektierbar war. Damit kann davon ausgegangen werden, dass Chlorin e6 in der Lage war aus endozytotischen Vesikeln in das Zytosol zu gelangen, anders als der Fluoreszenzmarker Atto647N und wahrscheinlich auch die zuvor beschriebenen siRNA-Chimären sowie das Aptamer-Gelonin-Konjugat. Dies kann eine Konsequenz der Prozessierung ins Lysosom der Zelle sein. Unter der Annahme des lysosomalen Abbaus der internalisierten Aptamer-RNA käme es zur Abspaltung von Chlorin e6, welches im lysosomalen Milieu (pH  $\approx$  5) aufgrund der Protonierung seiner Carbonsäuregruppen leicht Zellmembranen passieren könnte [281]. Alternativ möglich (aber unwahrscheinlicher) wäre auch, dass ein lysosomales Abbauprodukt, bestehend aus dem 3'-terminal letzten Nukleosid mit dem gebundenen Chlorin e6, über Nukleosidtransporter des Lysosoms aktiv ins Zytosol exportiert wurde [282]. Die säurekatalysierte Abspaltung von Chlorin e6 (gemäß dem Effekt Amid-benachbarter Säuregruppen) von der RNA konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Chlorin e6, welches von Zellen in Form von AIR-3A-ce6 aufgenommen worden war, wies eine deutlich höhere Retention in den Zellen auf, als solches, welches in Form des freien Photosensibilisators verabreicht wurde. Dies geht maßgeblich auf die schnelle Dissoziation

## DISKUSSION

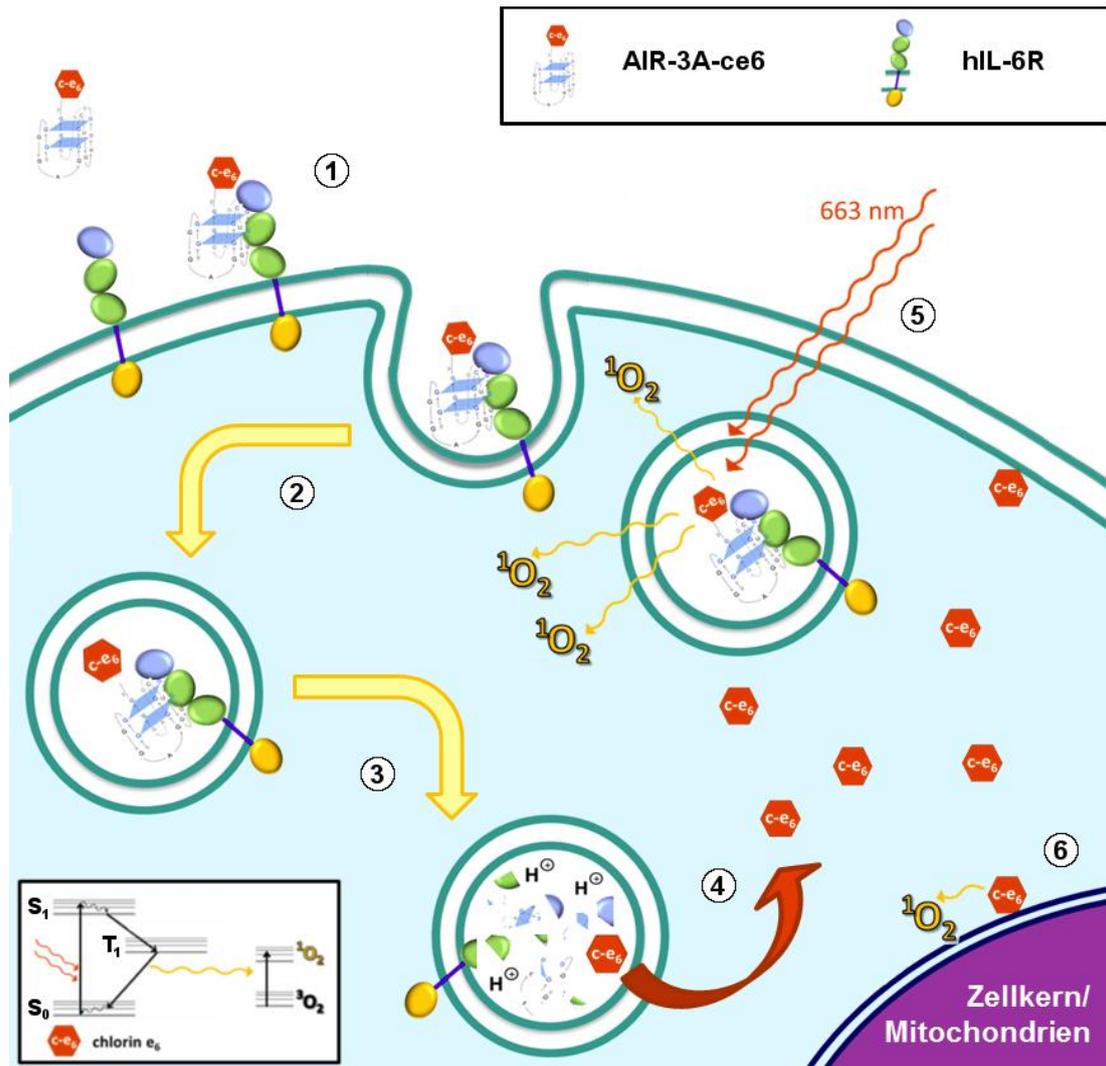
( $t < 4\text{h}$ ) von Chlorin e6 aus der äußeren Schicht der Zytoplasmamembran zurück, wo sich der amphiphile Photosensibilisator bei pH bevorzugt einlagert, wenn dieser als freies Molekül appliziert wird [283]. Dagegen wurde für Chlorin e6, wenn es als AIR-3A-ce6 internalisiert worden war, ein sehr langsames Entweichen aus den Zellen ( $t_{1/2} = 16\text{h}$ ) beobachtet. Auch diese Beobachtung kann durch die Amphiphilie des Chlorin e6-Moleküls erklärt werden, die ihm im pH-neutralen Bereich das Durchqueren von Doppellipidschichten nur sehr langsam durch einen Flip-Flop-Mechanismus gestattet. Damit blieb das internalisierte Chlorin e6 im Zytosol der Zelle „gefangen“. Durch diese Speicherung von aufgenommenen Chlorin e6 war es möglich, die Menge des Photosensibilisators in den hIL-6R-präsentierenden Zellen anzureichern. Praktisch erfolgte dies durch eine zweite bzw. dritte Inkubation mit AIR-3A-ce6. Die dritte Inkubation (und in noch stärkerem Maß eine vierte Inkubation; Daten hierzu nicht gezeigt) führte jedoch zu verringerter Zellvitalität, auch wenn im Dunkeln gearbeitet wurde (um eine Chlorin e6-Aktivierung zu vermeiden) ebenso in den Kontrollexperimenten mit freiem Chlorin e6 oder *shuffled* AIR-3A-ce6.

Zellspezifische Zytotoxizität konnte durch Aktivierung mit Licht der Wellenlänge von 663 nm erzielt werden, wenn die folgenden Voraussetzungen erfüllt waren: 1) Präsentation des Rezeptors, 2) Inkubation mit 50 nM AIR-3A-ce6, 3) Aktivierung des internalisierten Photosensibilisators durch LED-Bestrahlung. Der Anteil vitaler Zellen nach dieser Behandlung (*in vitro*-PDT) betrug  $45,6 \pm 1,8\%$  (bezogen auf unbehandelte Referenzzellen). Für den Fall, dass eine der Voraussetzungen 1) - 3) nicht erfüllt war, wurden keine signifikanten Vitalitätsunterschiede zu den unbehandelten Zellen festgestellt. Anhand einer Konzentrationsreihe wurde für freies Chlorin e6 die notwendige Konzentration von ca.  $5\ \mu\text{M}$  ermittelt, um einen gleichgroßen Rückgang an Zellvitalität zu bewirken. Damit zeigte AIR-3A-ce6 unter den gewählten Versuchsbedingungen eine 100-fache toxische Wirkung im Vergleich zu dem freien Chlorin e6. Durch Verwendung einer zweiten Inkubation mit AIR-3A-ce6 konnte der Anteil vitaler Zellen auf  $31,4 \pm 2,3\%$  gesenkt werden.

Über Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid konnten nach der durch AIR-3A-ce6 vermittelten *in vitro*-PDT früh-apoptotische ( $17,8 \pm 2,3\%$ ) und spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen ( $41,1 \pm 1,2\%$ ) nachgewiesen werden. Durch Verwendung einer zweiten Inkubation mit AIR-3A-ce6 wurde der Anteil früh-apoptotischer Zellen erhöht (früh-apoptotische Zellen:  $32,6 \pm 2,8\%$ , spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen:  $39,3 \pm 1,7\%$ ). Im Vergleich dazu wurde bei Verwendung von freiem Chlorin e6 durch Erhöhung der Photosensibilisator-Dosis nur ein Anstieg spät-apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen registriert, nicht aber früh-apoptotischer Zellen. Als sicher apoptotisch gelten bei dieser Nachweismethode nur die früh-apoptotische Zellen. Da nekrotische Zellen genauso wie spät-apoptotische doppelt positiv gefärbt werden, können diese nicht voneinander unterschieden

## DISKUSSION

werden. Es ist daher davon auszugehen, dass im Falle der aptamervermittelten *in vitro*-PDT maßgeblich apoptotisches Zellsterben erfolgte, in der *in vitro*-PDT mit freiem Chlorin e6 jedoch im Wesentlichen nekrotisches Zellsterben erfolgte. Dies wäre ein zusätzlicher Vorteil in einer möglichen therapeutischen Anwendung, da Apoptose im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktionen durch freigesetzte zytosolische oder lysosomale Stoffe zur Folge hat [284].



**Abbildung 47: Modell der durch AIR-3A vermittelten *in vitro*-PDT.** Nach Bindung an den hIL-6R auf der Zelloberfläche (1) erfolgt die Internalisierung des Rezeptor-gebundenen Konjugates AIR-3A-ce6 (2). Durch die Prozessierung in dem Lysosom (3) erfolgt die Degradierung des Rezeptors sowie des Aptamerkonjugates. Das dadurch freigesetzte Chlorin e6 liegt im lysosomalen Kompartiment (pH 5) protoniert vor. Damit kann das lipophile Chlorin e6 die Lysosomenmembran passieren (4). Es gelangt ins Zytosol, wo es deprotoniert wird und an Proteine oder Membranen bindet. Durch Bestrahlung mit langwelligem Licht erfolgt Photokonversion durch Chlorin e6 (5). Die dabei generierten reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. Singulett-Sauerstoff; siehe Jablonski-Diagramm unten links) rufen Zellschädigungen hervor. Geschieht dies in räumlicher Nähe zum Zellkern oder zu den Mitochondrien (6), wird die Wahrscheinlichkeit der Induktion von Apoptose erhöht.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Formen des Zelltods kann in der Lokalisation des Photosensibilisators liegen. Für unterschiedliche Photosensibilisatoren wurde Nekrose als dominante Form des Zelltods gefunden [174, 285], darunter auch Chlorin e6 [286]. Dies wird auf den Verlust der Integrität der Zytoplasmamembran in Folge oxidativer Schädigungen durch membranlokalisierte Photosensibilisatoren, wie Chlorin e6, zurückgeführt [287]. Für den Photosensibilisator Zinc-(II)-phthalocyanin (ZnPc) konnten Fabris *et al.* zeigen, dass nach kurzen Inkubationszeiten (< 2 h) der Photosensibilisator vornehmlich in der Zytoplasmamembran lokalisiert war und nach aktivierender Bestrahlung durch den dort erfolgenden oxidativen Schaden hauptsächlich Nekrose erfolgte. Dagegen konnte ZnPc nach längeren Inkubationszeiten in verstärktem Maß auch im Zellinneren lokalisiert werden (präferiert im Golgi-Apparat und später auch in Mitochondrien). Mit der Länge der Inkubationszeit nahm der Anteil apoptotischen Zellsterbens nach anschließender Bestrahlung, als auch die Sensitivität gegenüber der Bestrahlungsdosis zu. Aufgrund der korrelierenden Caspase-3-Aktivität, wurde dies auf zunehmende Schädigungen der mitochondrialen Membranen zurückgeführt [175]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Photosensibilisator Chlorin e6 verstärkt im Zytosol detektiert, wenn er aptamervermittelt von den Zellen aufgenommen wurde. Freies Chlorin e6 hingegen akkumuliert bekannterweise in der Zytoplasmamembran. Damit wäre eine Apoptose auslösende Schädigung von Zellorganellen wie den Mitochondrien oder des Zellkerns für die aptamervermittelte *in vitro*-PDT wahrscheinlicher als für die Behandlung mit dem freien Photosensibilisator.

Abbildung 47 illustriert zusammenfassend eine Modellvorstellung der zellulären Abläufe in der aptamervermittelten *in vitro*-PDT.

### 6.2.2 Wirkstoff-Transport von 5-FUR und 5-FUdR

Der aptamervermittelte Transport von therapeutisch wirksamen Nucleosid-Analoga ist bisher erst in einer Studie beschrieben worden. Dabei handelte es sich um den Transport eines Gemcitabin modifizierten RNA-Oligonucleotids in Bauchspeicheldrüsenzellen (MiaPaCa-2) durch das RNA-Aptamer E07, welches an den EGF-Rezeptor bindet [119]. Der Wirkstofftransport durch direkten Austausch von Aptamer-Nucleosiden gegen therapeutisch wirksame Analoga ist zuvor noch nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden die chemotherapeutisch wirksamen Nucleosid-Analoga 5-Fluoruridin (5-FUR) und 5-Fluor-2'-desoxyuridin (5-FUdR) in das Aptamer AIR-3 anstelle des natürlichen Uridins (30 Uridine pro Molekül) eingebaut. Diese Modifikationen wurden enzymatisch mittels *in vitro*-T7-Transkription unter Verwendung der entsprechenden Nucleosidtriphosphate erreicht. Im Falle von 5-FUR gelang dies mit dem Wildtyp-Enzym der T7-RNA-Polymerase, im Falle von 5-FUdR wurde die Variante Y639F verwendet.

## DISKUSSION

Vor der Analyse ihrer Zytotoxizität wurde für verschiedene RNA-Konstrukte mit 5-FUR- oder 5-FUdR-Modifikationen die Affinität an Hyper-IL-6 durch Filterretentionsstudien überprüft. Für das mit 5-FUR-modifizierte Aptamer AIR-3-FU wurde mit  $K_d = 74 \pm 8$  nM eine nur leicht verringerte Affinität gegenüber dem unmodifizierten AIR-3 ermittelt ( $K_d = 21 \pm 3$  nM). Dagegen wurde für das verkürzte Aptamer AIR-3A eine deutlich stärkere Abnahme der Affinität nach Modifizierung mit 5-FUR festgestellt. In AIR-3A wurden die drei Uridine des Aptamers gegen 5-FUR ausgetauscht und der 3'-Terminus um neun 5-FUR-Einheiten verlängert (AIR-3A-9U-FU). Für dieses Konstrukt wurde ein  $K_d$  von  $224 \pm 42$  nM für Hyper-IL-6 ermittelt.

Die Abnahme der Affinität durch Modifikation mit 5-FUR kann durch eine schwächere Wechselwirkung eines der drei Fluor-modifizierten Uridine aus dem Bindemotiv mit Aminosäureresten des Zielproteins bedingt sein. 5-FUR besitzt gegenüber Uridin eine veränderte Elektronendichteverteilung, wodurch z. B. die Azidität der N3-Position deutlich zunimmt [ $pK_s(\text{Uridin}) = 9,18$ ,  $pK_s(5\text{-FUR}) = 7,55$ ]. Damit liegt Uridin unter physiologischem pH nahezu vollständig protoniert vor, während 5-FUR etwa zu 50% deprotoniert und damit anionisch vorliegt [288]. Eine Wasserstoffbrücke an der N3-Position sowie ionische Wechselwirkungen wären dadurch beeinträchtigt. Ebenso kann die 5-FUR-Modifikation eine Beeinträchtigung der Quadruplex-Faltung zur Folge haben. Für die Bildung des Quadruplexes in AIR-3A wurde bereits eine geringere Toleranz gegenüber Nukleotidmodifikationen gefunden als für AIR-3 [8, 289]. Die Verlängerung des 3'-Terminus in AIR-3A-9U-FU könnte sich ähnlich negativ auf die Aptamerfaltung auswirken. Demgegenüber wurde jedoch keine signifikante Affinitätsminderung durch Verlängerung des 3'-Terminus für weitere Konstrukte der vorliegenden Arbeit gefunden (solche zum Transport von siRNAs oder hybridisierter Oligonukleotide mit Nukleosid-Analoga; Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtung wurde in der Folge für die 5-FUdR-Modifikation ausschließlich das unverkürzte Aptamer AIR-3 verwendet.

Für das 5-FUdR-modifizierte Aptamer AIR-3-FdU wurde mit  $K_d = 151 \pm 3$  nM eine größere Abnahme der spezifischen Affinität gegenüber dem Zielprotein ermittelt als für AIR-3-FU (74 nM). Dies ist insofern nicht überraschend, da erwartet werden kann, dass die Ribose-Einheiten an den Uridin-Positionen durch das Fehlen der 2'-OH-Gruppe eine Änderung der bevorzugten Ringkonformation erfahren (von der 3'-*endo*- zur 2'-*endo*-Konformation). Dies würde sich sowohl auf die Quadruplexfaltung, als auch auf die Orientierung der *Loop*-Regionen des Quadruplexes und damit mutmaßlich auf Interaktionen mit dem Zielprotein auswirken.

Für die Analyse der Bindung an hIL-6R-tragende Zellen wurde AIR-3-FU 3'-terminal fluoreszenzmarkiert. Es konnte durchflusszytometrisch eine Bindung an hIL-6R positive

## DISKUSSION

BaF3-Zellen nachgewiesen werden. Ein eindeutiger mikroskopischer Nachweis der Internalisierung gelang jedoch nicht. Dies wird auf die geringe Ausbeute der Fluoreszenzmarkierung von AIR-3-FU zurückgeführt. Da sich AIR-3-FdU nicht in derselben Weise fluoreszenzmarkieren lässt (da das 3'-terminale Desoxynucleosid sich nicht zur Glycolspaltung der Markierungsmethode eignet), wurde für die Bestimmung der Bindungsstärke an hIL-6R auf der Zelloberfläche ein indirekter Bindungstest durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass AIR-3-FdU mit  $K_d = 20 \pm 3$  nM an die selbe Bindungsstelle auf der Zelloberfläche bindet, wie Atto647N-markiertes AIR-3A. Für AIR-3A wurde in gleicher Weise eine Affinität mit  $K_d = 2,1 \pm 0,2$  nM ermittelt. Dies spiegelt das Verhältnis der Affinitäten zwischen der unmodifizierten und der modifizierten RNA wider, die zuvor in Filterretentionstests ermittelt worden war. Mit dieser Methode wurde für AIR-3-FU die Affinität zu hIL-6R tragenden BaF3-Zellen bestimmt mit  $K_d = 10,2 \pm 0,4$  nM. Damit konnte für beide Aptamervarianten eine spezifische Bindung im zweistelligen nanomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden.

Daraufhin wurden die zellulären Effekte der Aptamervarianten AIR-3-FU und AIR-3-FdU untersucht. Da beide Aptamervarianten innerhalb kurzer Zeit ( $t < 1$  min) in serumhaltigen Zellkulturmedium degradiert wurden, erfolgten die Inkubationen zur Aptamer vermittelten Aufnahme in Abwesenheit von fötalem Kälberserum. Im Anschluss an die Aptameraufnahme wurden die Versuchszellen soweit gewaschen, dass Vitalitätseinbußen infolge extrazellulärer Degradierung der RNA ausgeschlossen werden konnten. Eukaryotische Zellen nehmen über Nucleosid-Transporter die Degradationsprodukte 5-FUR bzw. 5-FUdR auf. In der Praxis wurde daher zwischen der Aptamerinkubation und dem Reinkultivieren eine definierte Anzahl von Zentrifugations- und Verdünnungsschritten vollzogen. Die Konzentration von Aptamer-RNA, oberhalb derer in einem Zeitraum von 72 h keine unspezifische Beeinträchtigung über aufgenommene Degradationsprodukte erfolgte, betrug für AIR-3-FU 300 pM und für AIR-3-FdU 15 pM.

Für AIR-3-FdU konnten Aptamer-spezifische Effekte bei hIL-6R präsentierenden Zellen nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit AIR-3-FdU erfolgte ein hIL-6R-abhängiger Rückgang der Zellproliferation um  $25 \pm 4\%$  der Zelllinie BaF3. Die durchflusszytometrische Analyse der anteiligen Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zeigte einen Anstieg von Zellen in der S-Phase von  $31 \pm 2\%$  (Referenzzellen) auf  $44 \pm 1\%$  4 h nach der Inkubation. Zudem wurde ein Anteil an apoptotischen Zellen von  $14 \pm 1\%$  zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen. Nach 12 h hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Referenzzellen festgestellt werden. Sowohl die Erhöhung des Anteils von S-Phase-Zellen als auch das Vorhandensein von apoptotischen Zellen konnte verhindert werden, wenn das Experiment in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  2'-Desoxythimidin (TdR) durchgeführt



## DISKUSSION

Durch eine externe dTMP-Quelle konnte dieser Effekt kompensiert werden. Es wurde versucht, durch externe Zugabe des  $\text{CH}_2\text{THF}$ -Vorläufers Leucovorin (5-Formylterahydrofolat), den zytotoxischen Effekt zu verstärken. In Anwesenheit von  $50\ \mu\text{M}$  Leucovorin wurden jedoch nur ein insignifikant höherer Anteil an apoptotischen Zellen ( $15,5 \pm 0,8\%$ ) registriert. Eine Ursache hierfür könnte die unzureichende Reduktion von Leucovorin zu  $\text{CH}_2\text{THF}$  in BaF3-Zellen sein. Abbildung 48 zeigt eine Übersicht der angenommenen Wirkungsweise von AIR-3-FdU.

Dagegen wurden für AIR-3-FU keine biologischen Effekte beobachtet, die der aptamervermittelten Aufnahme des Chemotherapeutikums zugeschrieben werden konnten. Dies schloss den Einsatz von Methotrexat (MTX) als Synergist für Zellschädigungen auf der RNA-Ebene ein (siehe Abschnitt 1.4.1). MTX wirkt als Inhibitor der Dihydrofolatreduktase (DHFR), welche Dihydrofolat (DHF) in Tetrahydrofolat (THF) umwandelt. THF ist notwendig für die Purin-Biosynthese und, als Vorläufer von  $\text{CH}_2\text{THF}$ , ebenso für die Thymidin-Biosynthese. MTX wurde als Synergist für 5-FU identifiziert. Diese Wirkung beruht auf einer Erhöhung der Konzentration von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), dem Co-Faktor für die Metabolisierung von 5-FU zu 5-Fluoruridin-5'-monophosphat (FUMP) durch die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase (OPRT) [191]. Dieser Synergismus wurde erstmalig für Anwendungen in Leukämiezellen von Cadman *et al.* beschrieben. Danach handelt es sich um zytotoxische Effekte für die Verabreichungen großer 5-FU-Stoffmengen in kurzer Zeit. Voraussetzung ist jedoch das Vorliegen der freien Base 5-Fluoruracil in den Zellen und der Abhängigkeit der Zelllinie von dem oben beschriebenen Stoffwechselweg zur Synthese von Nukleosidtriphosphaten [291]. Ob dies jedoch im Fall der Aufnahme von AIR-3-FU durch BaF3-Zellen zutrifft, ist unbekannt.

In Anwesenheit von fötalem Kälberserum wurde für 5-FUR-RNA-Konzentrationen  $> 300\ \text{pM}$  ein Aptamer-unspezifischer Rückgang der Zellproliferation beobachtet. In der Analyse der Zellzyklusfraktionen zeigten solche Zellen ebenfalls den für FdUMP typischen Effekt eines Anstiegs von Zellen in der S-Phase. Für 5-FUdR-RNA Konzentrationen  $> 15\ \text{pM}$  wurde der gleiche Aptamer-unspezifische Effekt registriert. Dies lässt darauf schließen, dass für die Zelllinie BaF3 bei der Behandlung mit 5-FU-Derivaten generell der Metabolit FdUMP entscheidend ist. Die Sensitivität gegenüber Derivaten bzw. Metaboliten von 5-Fluoruracil ist im Allgemeinen zelllinienspezifisch. Zellen mit erhöhter Sensitivität gegenüber FUdR-Derivaten, wie in diesem Fall BaF3, weisen neben einer hohen Proliferationsrate meist eine hohe Pyrimidin-Kinase-Aktivität auf [292]. Für Tumorzellen dieser Art ist dokumentiert, dass sich eine kontinuierliche FUdR-Zufuhr effektiver auswirkt, als kurzzeitige Zugabe größerer Stoffmengen [293].

Aus diesem Grund und um eine Anwendung *in vivo* überhaupt aussichtsreich zu machen, kam daher der Erhöhung der Aptamerstabilität größere Aufmerksamkeit zu. Die Stabilität von AIR-3-FdU in serumhaltigem Zellkulturmedium konnte bereits durch Austausch der Cytidine gegen 2'-fluorsubstituierte Cytidine verbessert werden. Die entsprechende Variante AIR-3-FdU-2'FC hatte in Anwesenheit von 10% (v/v) fötalen Kälberserum eine Halbwertszeit von ca. 5 h. Durch diese Modifikation wurde die Affinität des Aptamers weder zu Hyper-IL-6 ( $K_d = 191 \pm 6$  nM) noch zu hIL-6R präsentierenden Zellen ( $K_d = 62 \pm 4$  nM) signifikant beeinträchtigt. Die Optimierung der Inkubationsbedingungen wie Konzentrationen, etwaige Waschschrte und Inkubationszeit müssen jedoch noch erfolgen.

### 6.3 Analyse der Bindungsstelle von AIR-3A an hIL-6R

Die Bindungsstelle von AIR-3A an hIL-6R wurde bereits in den Arbeiten von Dr. C. Meyer [167] und Dr. K. Eydeler [169] untersucht. Hierbei konnte in Kompetitionsstudien gezeigt werden, dass AIR-3A weder mit hIL-6 noch mit löslichem gp130 um eine Bindungsstelle an hIL-6R konkurriert [167]. Für die Bindung an hIL-6 bzw. gp130 sind die hIL-6R-Domänen D2 und D3 verantwortlich [155]. Zudem konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass AIR-3A nicht mit einem anti-IL-6R-Antikörper konkurriert, welcher im Bereich von Domäne D2 und D3 bindet [169]. Filterretentionsstudien haben zudem gezeigt, dass AIR-3A nicht an die separate Proteindomäne D3 bindet [169]. Aus diesen Vorinformationen wurde die Domäne D1 als wahrscheinlichster Proteinabschnitt für die Bindungsstelle von AIR-3A angenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode zum selektiven und bindungsstellenspezifischen *cross linking* (XL) von AIR-3 oder AIR-3A an Hyper-IL-6 etabliert. Dafür wurden zwei XL-Methoden untersucht, eine EDC aktivierte und eine durch UV-Aktivierung. In der EDC aktivierten XL-Methoden wurden zwar spezifische XL-Produkte von AIR-3 erhalten, jedoch mit unter 1% kovalent verknüpfter RNA deutlich geringere Ausbeuten erzielt, als mit der UV-aktivierten Alternative.

Die spezifische Reaktion von AIR-3 mit Hyper-IL6 nach Aktivierung mit EDC ergab dennoch Informationen über die Reste, die an Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und dem Protein beteiligt sind. Die durch EDC induzierte Bindung war nicht unter der anschließenden Behandlung mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) stabil. Dies spricht gegen eine üblicherweise durch EDC-XL generierte Amidbindung (über eine exozyklische Aminogruppe der Nukleobasen zu einem Aspartat- oder Glutamatrest). Unter Berücksichtigung der in RNA und Proteinen vorhandenen funktionellen Gruppen (aktiviert werden nur Säurereste) wäre die einzige zu dieser Beobachtung passende Erklärung, dass die Reaktion eines Phosphates

## DISKUSSION

der RNA mit einem Tyrosinrest stattgefunden hatte. Der hierbei entstehende Phosphorsäurephenylester wäre empfindlich gegenüber der Thiolyse durch 2-ME (analog zur Reaktion des Cysteinrestes in den Tyrosin-Phosphatasen). Dies deutet auf das Vorhandensein eines Tyrosinrestes von hIL-6R innerhalb der Bindestelle hin.

Die UV-aktivierte Konjugation von AIR-3A mit Hyper-IL-6 lieferte hingegen Ausbeuten von bis zu 5% kovalent verknüpfter RNA. Über die chemische Natur der erfolgten Bindung(en) konnten keine weiteren Informationen gewonnen werden. Am wahrscheinlichsten wäre aufgrund der Photoreaktivität eine Reaktion eines der Uridine mit einem Tyrosin-, Phenylalanin-, Tryptophan- oder Lysinrest [218].

Aus den anschließend durchgeführten Studien (Abschnitt 5.5.3) mittels kovalenter Verknüpfung von AIR-3A und Hyper-IL-6 konnten die oben beschriebenen Vermutung früherer Arbeiten bestätigt und weitere Hinweise zur genauen Lage der Bindungsstelle erhalten werden. Hierfür wurden die tryptischen Peptiden eines kovalent verknüpften Produktes von AIR-3A und Hyper-IL-6 massenspektrometrisch (MS) analysiert und mit denen des reinen Proteins (Hyper-IL-6) verglichen. Eine deutliche Abnahme der Intensität, oder vollständiges Fehlen des Signals eines Peptids aus dem UV-XL-Produkt, deutet auf das Vorhandensein kovalent gebundener Aptamer-RNA in diesem Peptid hin. Solche Peptide (bzw. Teile ihres Sequenzabschnittes) galten als mutmaßlich an der Aptamerbindung zu hIL-6R beteiligt. Die Messexperimente wurden von Herrn M.Sc. M. Kwiatkowski (AG Schlüter, UKE) durchgeführt, optimiert und schließlich mehrfach wiederholt ( $n = 6$  für das reine Protein und  $n = 4$  für das UV-XL-Produkt). Über die Datenbank gestützte Analyse mittels der Software *Mascot* und *flexAnalysis* konnte anschließend der bindungsrelevante Proteinbereich (Domänen D1 und D2) zu 79% abgedeckt werden. Nicht erfasste Sequenzbereiche konnten aus massenspektrometrisch schwer zugänglichen Peptiden ( $M \gg 3$  kDa) oder unvollständiger tryptischer Restriktion resultieren. Zur Validierung der Methode wurden daher nur Peptide des UV-XL-Produktes für die Bindungsstelle in Betracht gezogen, deren Massensignal in keinem der vier Messexperimente des UV-XL-Produktes gefunden werden konnte, die jedoch in mindestens drei der sechs Messungen des reinen Proteins deutliche Massensignale lieferten.

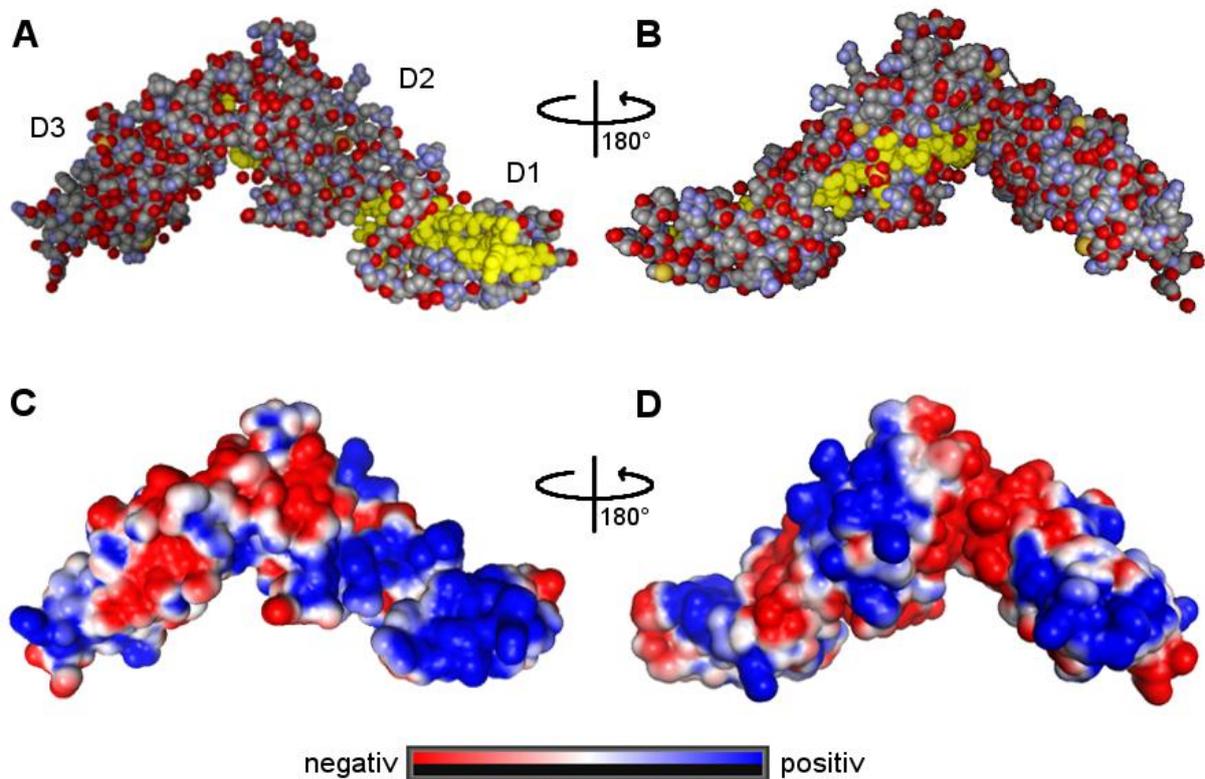
Nach den beschriebenen Kriterien wurden zwei Sequenzabschnitte ermittelt, die mutmaßlich an der Aptamerbindung beteiligt sind (Abbildung 49A und B, gelb markierter Bereich). Dabei handelt es sich um zwei in der Kristallstruktur von hIL-6R räumlich benachbarte Bereiche mit den folgenden Aminosäuresequenzen:

- 1) S<sub>66</sub>VQLHDSGNYSYR<sub>79</sub>
- 2) P<sub>83</sub>AGTVHLLVDVPPEEPQLSCFR<sub>104</sub>

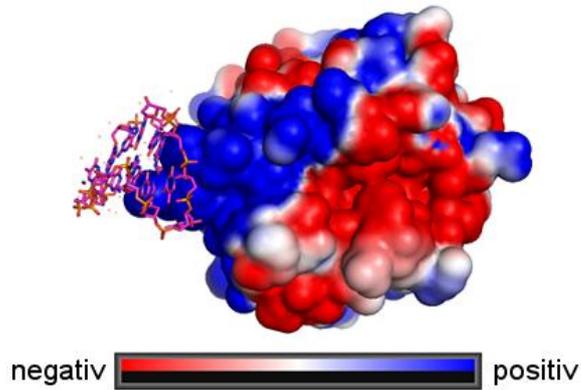
## DISKUSSION

Diese beiden Sequenzabschnitte verlaufen als benachbarte antiparallele Stränge (Strang F und G) eines  $\beta$ -Faltblattes der Immunglobulin-ähnlichen Strukturdomäne D1 und sind durch eine  $\beta$ -Schleife (R<sub>79</sub>AGR<sub>82</sub>) miteinander verbunden.

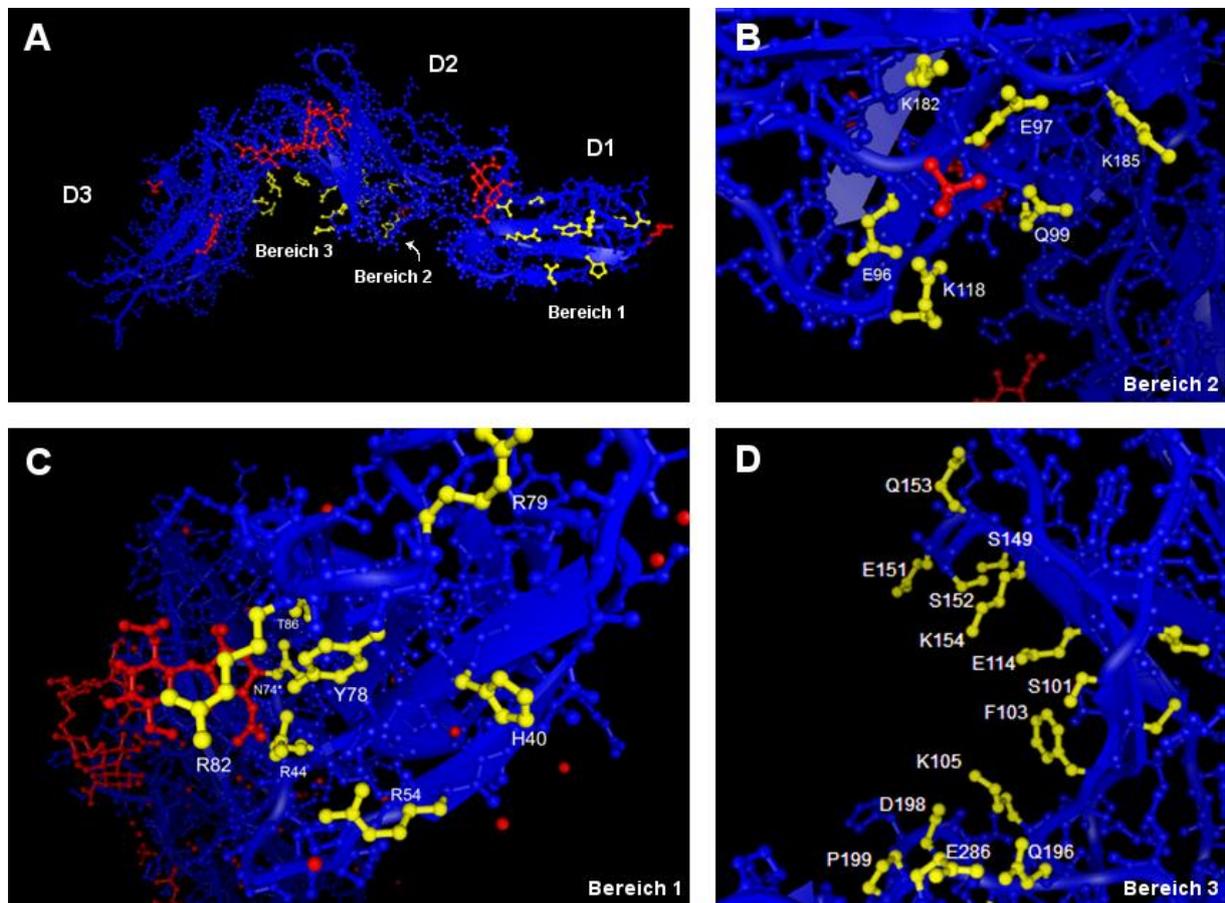
Zur Identifikation möglicher Bindungsstellen wurden weitere Analysen der Proteinoberfläche unternommen. Aus einer Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials des hIL-6R konnten die positiv geladenen Oberflächenbereiche ermittelt werden (Abbildung 49C und D). Diese sind, aufgrund des polyanionischen Charakters von Nukleinsäuren, als Bindungsstellen von Aptameren prädestiniert. Ein Beispiel stellt der Komplex von Thrombin mit dem Thrombin bindenden DNA-Aptamer (TBA) dar, dessen Kristallstruktur in Abbildung 50 wiedergegeben ist [248].



**Abbildung 49: Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Bereichs von hIL-6R (PDB: 1N26) [151]. A) und B) Möglicher Sequenzbereich der Aptamerbindung (gelb) anhand der massenspektrometrischen Analysen des UV-XL-Produktes von Hyper-IL-6 und AIR-3A. C) und D) Verteilung des elektrostatischen Oberflächenpotentials [berechnet von Prof. Dr. M. Zacharias (TU München) mittels *adaptive Poisson-Boltzmann solver*]. Abbildung A) und C) sowie C) und D) zeigen das Protein in identischer Orientierung.**



**Abbildung 50: Röntgenkristallstruktur des Thrombin-bindenden Aptamers (TBA) mit Thrombin (PDB: 4DII) [248].** Für das Protein wurde entsprechend hIL-6R in Abbildung 49 das elektrostatische Oberflächenpotential ermittelt (berechnet von Prof. Dr. M. Zacharias, TU München). TBA bindet im stark elektropositiven Oberflächenbereich.



**Abbildung 51: Ausgewählte mögliche Bindestellen des hIL-6R für das Aptamer AIR-3A.** A) Gesamtansicht von hIL-6R. rot: Glykosylierungen. gelb: Aminosäurereste möglicher Bindestellen. B) Möglicher Bindestellenbereich (2) um E<sub>97</sub>. rot: in der Kristallstruktur gebundenes Phosphation. C) Möglicher Bindestellenbereich (1) um Y<sub>78</sub>. D) Möglicher Bindestellenbereich (3) um F<sub>103</sub>.

Es wurden die aus den MS-Analysen erhaltenen Sequenzbereiche mit den Regionen positiven Oberflächenpotentials verglichen. Die Bereiche ihrer Überlappung wurden anschließend nach Aminosäureresten untersucht, die eine erhöhte Reaktivität für UV-cross

## DISKUSSION

*linking* zu Nucleinsäuren besitzen [215, 218, 220, 225, 294] (siehe Abschnitt 1.5.1) und in räumlicher Nähe zu Aminosäureresten stehen, die für Wechselwirkungen mit RNA besonders geeignet wären [236, 237] (siehe Abschnitt 1.5.2).

Es wurden drei Bereiche als am wahrscheinlichsten für die Bindestelle von AIR-3A identifiziert (Abbildung 51). Hierbei handelt es sich um

- (1) den Bereich um Y<sub>78</sub> (Abbildung 51C),
- (2) den Bereich um E<sub>97</sub> (Abbildung 51B) und
- (3) den Bereich um F<sub>103</sub> (Abbildung 51D).

Von diesen wird Bereich (1) aus folgenden Gründen als bedeutenster postuliert:

1. Bereich (1) liegt im größten ununterbrochenen Bereich elektropositiv geladener Proteinoberfläche von hIL-6R (Vgl. Abbildung 49A und C).
2. Bereich (1) schließt beide ermittelten Peptide aus den MS-Experimenten ein.
3. In Bereich (1) sind mehrere für Nucleinsäurebindungen (R<sub>44</sub>, R<sub>54</sub>, R<sub>79</sub>, R<sub>82</sub>, H<sub>40</sub>) bzw. UV-XL (H<sub>40</sub>, Y<sub>78</sub>) geeignete Aminosäurereste präsent.
4. Im Zentrum von Bereich (1) befindet sich mit Y<sub>78</sub> ein Aminosäurerest, durch den die Ergebnisse des EDC-aktivierten *cross linkings* erklärt werden können.
5. Bereich (1) liegt in Proteindomäne D1 (siehe vorherige Ausführungen).

Die Bereiche (2) und (3) wurden als alternative Bereiche ausgewählt und befinden sich im Bereich der Domäne D2. Für Bereich (2) (Abbildung 51B) spricht die Lage zweier Glutamat-Reste (E<sub>96</sub> und E<sub>97</sub>), die für den beschriebenen EDC-XL besonders geeignet wären (siehe Abschnitt 5.5.1), sowie die Lage mehrerer Lysinreste (K<sub>118</sub>, K<sub>182</sub> und K<sub>185</sub>), welche in der Kristallstruktur ein Phosphation binden. Für Bereich (3) spricht die Anhäufung diverser Aminosäurereste, die sich als H-Brücken-Akzeptor- oder H-Brücken-Donor eignen und um einen UV-XL-reaktiven Phenylalaninrest gruppiert sind. Dieser Bereich entspricht einer Einbuchtung ( $d \approx 20 \text{ \AA}$ ) zwischen den Domänen D2 und D3, in die ein RNA-G-Quadruplex eingebunden werden könnte.

Die mögliche Bindestelle von AIR-3A innerhalb der Domäne D1, könnte den intrazellulären Transport des Rezeptors verändern, da Domäne D1 zumindest für den sekretorischen Transport eine Schlüsselfunktion zukommt [150]. Ob hierdurch der subzelluläre Transport von endozytiertem hIL-6R verändert wird, z.B. zu verstärktem Transport ins Lysosom führt, könnte durch Co-Lokalisationen mit fluoreszenzmarkiertem anti-hIL-6R-Antikörper untersucht werden.

Seitens des Aptamers konnten ebenso Informationen über bindende Nucleotide gewonnen werden. Bereits in der Arbeit von Dr. K. Eydeler sowie nachfolgenden Experimenten im

## DISKUSSION

Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Hahn konnten mittels Filterretentionsstudien und Oberflächenplasmonresonanzstudien (SPR) Nukleotide identifiziert werden, die für die Affinität von AIR-3A zu Hyper-IL-6 entscheidend sind [8, 169]. Danach führte der Austausch folgender Purinbasen durch Uracile zu vollständigem Verlust bzw. starker Verringerung der Affinität des Aptamers:

**G2, G4, G6, G7, G10, G12, G13, G15, G17, G18, G19** → Verlust der Affinität

G3, A5 A16 → Verringerung der Affinität

Die fettgedruckten Guanosine können als maßgeblich beteiligt an der Faltung des G-Quadruplexes angenommen werden, da ihr Austausch ebenfalls zu deutlich verminderter Schmelztemperatur des Aptamers führte (in Anwesenheit von 5 mM Kaliumchlorid; bestimmt durch Absorptionsmessungen bei 295 nm). Der Austausch von G1 hingegen hatte keinen Einfluss auf die Affinität und Stabilität des Aptamers. Ebenso hatte der Austausch der Pyrimidinnukleotide gegen Adenosine für C8 keinen Einfluss auf die Affinität und Stabilität sowie für U9 und U14 keinen oder nur geringen Einfluss auf die Affinität des Aptamers. Für den Austausch von U11 durch Adenosin wurde hingegen eine deutliche Abnahme der Affinität gefunden.

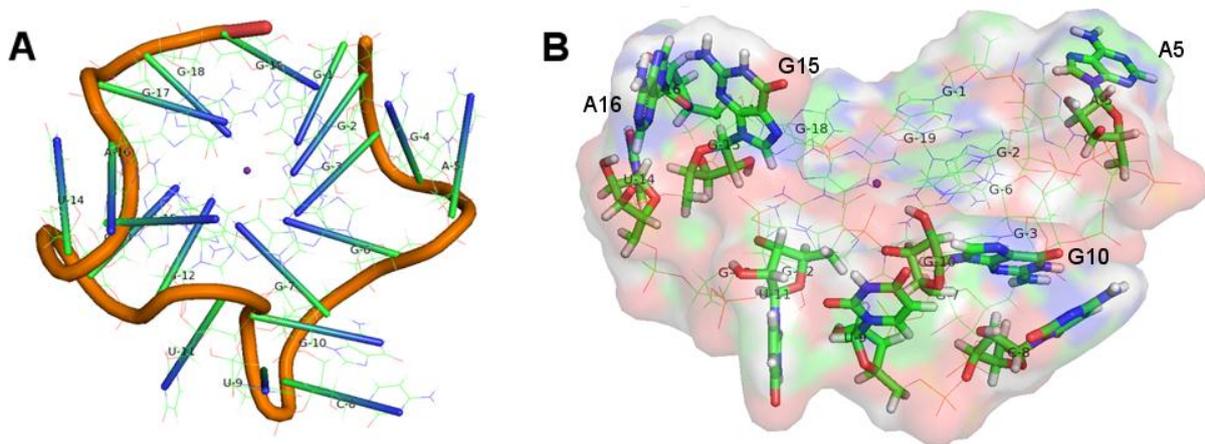
In dieser Arbeit wurden Fragmentierungen des kovalent an Hyper-IL-6 gebundenen Aptamers AIR-3A (UV-XL-Produkt) durchgeführt und gelelektrophoretisch analysiert. Durch RNase A-Fragmentierung eines UV-XL-Produktes konnte nachgewiesen werden, dass im Bereich der ersten sieben Nukleotide (5'-terminal) eine kovalente Verknüpfung des Aptamers zum Zielprotein erfolgte. Aus Fragmentierungen des UV-XL-Produktes mit RNase T1, konnte ein Hinweis auf A5 als kovalent verknüpftes und damit an hIL-6R bindendes Nukleotid erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

Die Interpretation der Fragmentierungen des UV-XL-Produktes mit Imidazol erwiesen sich aufgrund der unterschiedlichen Bandenintensität als schwierig. Dies kann durch unvollständige Rückgewinnung der jeweiligen Nukleotide in der Aceton-Präzipitation bedingt sein. Eine nicht gleichmäßige Fragmentierung von AIR-3A. kann ebenfalls angenommen werden, da bei der im Gel erfolgten Fragmentierung nicht gewährleistet werden kann, dass das kovalent verknüpfte Aptamer vollständig entfaltet werden konnte. So wurden für Nukleotidpositionen in den putativen *Loop*-Regionen von AIR-3A deutlich intensivere Fragmentensignale erhalten. Aus der Sequenziergelanalyse lässt sich zumindest folgendes ableiten: 1) Es wurden zum einen proteinfreie RNA-Fragmente bis zu Position U11 detektiert. Hierdurch kann auf das Nukleotid G12 als weiteres an hIL-6R bindendes Nukleotid geschlossen werden. 2) Aus dem Übergang von U9 zu G10, welches in der Imidazolfragmentierung nahezu nicht sichtbar war, könnte eine kovalente Bindung von G10

## DISKUSSION

zum Protein abgeleitet werden. Für die Punktvariante AIR-3A, in welcher G10 durch ein Uridin ausgetauscht worden war, wurden zudem deutlich geringe Ausbeuten an UV-XL-Produkt als für AIR-3A erhalten. Diese stützt die Annahme, dass es sich bei G10 um ein durch UV-Bestrahlung an Hyper-IL-6 konjugierbares Nukleotid handelt. Diese Resultate stehen im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen der oben erwähnten Studien.

Um ein näheres Verständnis der Faltung von AIR-3A zu erhalten, wurden bioinformatische Simulationen der G-Quadruplexstruktur von Prof. Dr. M. Zacharias (TU München) durchgeführt. Hierbei wurden die in den vorherigen Absätzen beschriebenen Erkenntnisse zur Struktur von AIR-3A noch nicht berücksichtigt. Als Templat für einen zwei G-Tetraden enthaltenden RNA-G-Quadruplex wurde eine mittels NMR-Spektroskopie bestimmte Struktur (PDB: 1MY9) verwendet [295]. In Abbildung 52 ist das Ergebnis für die optimierte Struktur dargestellt.



**Abbildung 52: Bioinformatische Simulation der G-Quadruplexstruktur von AIR-3A.** Als Vorlage für die Strukturvorhersage diente die NMR-basierte Struktur eines dimeren RNA-G-Quadruplexes (PDB: 1MY9) [295]. Die Simulation für die abgebildeten Strukturen wurde von Prof. Dr. M. Zacharias durchgeführt. A) Schematische Darstellung der Orientierung des Rückgrats und der Nucleobasen von AIR-3A. B) Raumfüllende Darstellung mit hervorgehobenen Nucleobasen der drei Loopregionen. Im Zentrum wurde jeweils ein Kaliumion gesetzt (lila).

Die Oberfläche des simulierten G-Quadruplex besitzt eine stark abgeflachte sphärische Form mit den Dimensionen von ca.  $28 \times 29 \times 8 \text{ \AA}$ . Dies entspricht etwa der Größe einer Proteindomäne von hIL-6R. Obwohl für diese Struktursimulation nur wenige Vorgaben gemacht wurden, entspricht das Ergebnis zu einem gewissen Teil den experimentellen Ergebnissen. So liegen die Basen der Nucleotide A5, G10, G15 und A16 oberhalb der Tetraden des Quadruplexes (Abbildung 52B). Dies entspräche den Ergebnissen aus den UV-XL-Analysen, die für A5 und G10 eine Bindung zum Protein vermuten lassen. Allerdings sind für eine exakte Vorhersage der 3D-Struktur weitere Informationen notwendig, so z.B. welche Guaninbasen definitiv an einer Tetrade beteiligt sind und ob nicht ein Quadruplex mit drei Tetraden durch das Ausbilden von *bulges* vorliegt [296] bzw. ein dimerer RNA-Komplex.

## 7 AUSBLICK

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Anwendungen der RNA-Aptamere AIR-3 und AIR-3A für den aktiven Wirkstofftransport. AIR-3 und AIR-3A binden spezifisch den humanen Interleukin-6-Rezeptor und werden mit diesem in das Zellinnere endozytiert. In dieser Arbeit konnten Indizien für den Transport des internalisierten Aptamers in das Lysosom von IL-6R positiven BaF3-Zellen geliefert werden. Eine genauere Charakterisierung des Transportvorganges innerhalb der Zelle gilt es künftig zu klären. Hierfür wird die Verwendung zeitlich und räumlich höher auflösender Varianten der in dieser Arbeit angewandten konfokalen *Laser Scanning* Mikroskopie vorgeschlagen. Das Abrastern durch den Laser des verwendeten Mikroskops erfolgte Punkt für Punkt, wodurch für genügend intensive Signale relativ lange Detektionszeiten erforderlich waren. Dies hat im Fall von Lebendpräparaten eine begrenzte zeitliche Auflösung und eine hohe Stressbelastung für die Zellen durch das Anregungslicht zur Folge. Konfokale Lasermikroskopie mit *spinning disc* Optik böten hier eine sinnvolle Verbesserung. Bei ihnen wird das Präparat deutlich schneller abgerastert, da anstelle einer statischen Lochblende eine rotierende Nipkow-Scheibe mit einer Vielzahl spiralförmig angeordneter Lochblenden verwendet wird.

Als Alternative zur Endmarkierung mit Fluorophoren könnten auch interne Fluoreszenzmarkierungen des Aptamers vorgenommen werden. Eine intrinsische Markierung von AIR-3 konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit bereits durch Verwendung des fluoreszenten Cytosin-Analogons 1,3-Diaza-2-oxophenothiazinribose (tC) realisiert werden [297]. Das so modifizierte Aptamer wies in Filterretentionsstudien noch die Affinität für Hyper-IL-6 auf. Durch gleichzeitige Markierung mit Atto647N oder Alexa647 könnten Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzlabels Aufschluss über den zeitlichen Verlauf des intrazellulären Abbaus des Aptamers liefern. Ebenso könnte die Quantifizierung des internalisierten Aptamers sowie der zeitliche Verlauf einer Degradation in der Zelle mittels quantitativer-RT-PCR erfolgen.

Der zur Co-Lokalisation mit dem Endosom und dem Lysosom getestete Fluoreszenzfarbstoff AIPcS<sub>4</sub> könnte zudem als *endosomal escape agent* verwendet werden. AIPcS<sub>4</sub> ist als Photosensibilisator im langwelligen Bereich anregbar und erzeugt in Folge von Photokonversion zelluläre Schäden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AIPcS<sub>4</sub> selektiv in endolysosomalen Membranen akkumuliert und über einen Zeitraum von mehr als 24 h dort verbleibt. Unter der Voraussetzung, dass eine Bestrahlungsdosis ermittelt werden kann, unter welcher sich der zelluläre Schaden auf die endolysosomalen Vesikelmembranen beschränkt, wäre AIPcS<sub>4</sub> als Adjuvant für die Freisetzung von siRNA-Chimären ins Zytosol geeignet.

Durch kovalente Konjugation des Photosensibilisators Chlorin e6 mit AIR-3A konnte dieser selektiv in IL-6R-positive Zellen befördert werden. Nach Anregung mit LED-Licht konnte anschließend apoptotisches Zellsterben in den Zielzellen eingeleitet werden. Dieses Prinzip ließe sich noch verbessern, indem mehrere Einheiten von Chlorin e6 pro Aptamer gekoppelt werden. Das Steigern der Kopplungsausbeute (bisher 60-72%) als auch die Verwendung multimodaler Einheiten über dendrimere Linker wären hierzu denkbar. Die Verwendung anderer Photosensibilisatoren, z. B. Metallionen tragender, könnte zudem höhere Quantenausbeuten in der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff zur Folge haben. Eine Kombination mit dem untersuchten Nukleosid-Analogen 5-FUdR wäre theoretisch ebenso möglich. Eine simultane Modifikation mit beiden Effektormolekülen wäre jedoch präparativ anspruchsvoller. Hierfür müssten zunächst neue Konjugationsstrategien etabliert werden. Eine Möglichkeit wäre die posttranskriptionale Konjugation von AIR-3-FdU mit Chlorin e6, die allerdings das Hinzufügen einer terminalen Aminogruppe voraussetzte. Die hierfür anwendbaren Verfahren (5'-terminal durch Initiator-nukleotide, 3'-terminal durch Ligation) sind jedoch noch nicht etabliert. Da für diese Reaktionen geringe Ausbeuten erwartet werden, müssten zusätzliche Reinigungsschritte zur Abtrennung der Vorstufen erfolgen. Dies macht eine deutlich höhere Materialmenge erforderlich.

Ein erster Schritt zur Weiterentwicklung der hier beschriebenen selektiven Zulieferung eines chemotherapeutischen Nukleosid-Analogons durch AIR-3-FdU ist bereits durch die serumstabilere Variante AIR-3-FdU-2'-FC erfolgt. Die Analyse der zellulären Effekte dieser Variante wären die nächsten Schritte. Weitere Modifikationen, wie 3'-*invT* und 5'-PEG-Modifikation sollten jedoch noch vor *in vivo*-Anwendungen erfolgen. Zudem lässt sich das Konzept ausdehnen auf andere therapeutisch wirksame Nukleosid-Analoga, wie Gemcitabin als Ersatz für Cytidine des Aptamers (siehe Abschnitt 1.4) bzw. auf andere Aptamere, die nachweislich in Zellen endozytiert werden und dort der Prozessierung ins Lysosom unterliegen. Das Adenosin-Analogen Cladribin stellt eine sinnvolle Alternative zu 5-FUdR dar, da es sich bei ihm um ein Therapeutikum handelt, welches zur Behandlung von Lymphomen eingesetzt wird. Zudem beeinflusst es gütig den Verlauf schubförmig remittierender MS, einer Erkrankung, die direkt mit erhöhter IL-6R-Expression im Zusammenhang steht (siehe Abschnitt 1.2.1) [298]. Die Zulassung als Therapeutikum zur Behandlung eben dieser Krankheit wurde jedoch bisher sowohl durch die US-amerikanische als auch die europäische Gesundheitsbehörde aufgrund von systemischen Nebenwirkungen abgelehnt (Stand Aug. 2014). Ein interessanter Ansatz wäre auch die Verwendung virostatischer Nukleosid-Analoga (siehe Abschnitt 1.4), zur Behandlung des viralen Befalls der IL-6R präsentierenden Zellen, wie Hepatozyten. Konkrete Beispiele wären das Guanidin-Analogen Entecavir [188] gegen Hepatitis B oder das Uridin-Analogen Sofosbuvir [299] (bzw. dessen Nukleosidform) gegen Hepatitis C. Dies ist insofern von besonderem Interesse, da

für AIR-3A bereits eine antivirale Wirkung mit der Inhibition der HIV-Integrase und der Verringerung der HIV-Infektion in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden konnte [280, 300].

Die Bindungsstelle von AIR-3A an Hyper-IL-6 wurde in dieser Arbeit über die kovalente Verknüpfung (*cross linking*) der beiden Biomoleküle untersucht. Die aus den *cross linking*-Experimenten erhaltenen Ergebnisse der RNA- und Proteinfragmente können zukünftig für *Docking*-Simulationen des Aptamers an die ermittelten mutmaßlichen Bindungsstellen am hIL-6R genutzt werden. Um hierbei verlässlichere Ergebnisse zu erzielen, sollten weitere Versuche zur Strukturaufklärung von AIR-3A erfolgen. Dafür kann *RNA footprinting* in Form von *chemical probing* [301] sowie *enzymatic probing* [302] zur exakteren Kenntnis der Topologie von AIR-3A eingesetzt werden. Ebenso wären über Kaliumsalz-Titrations die Anzahl der Tetraden im G-Quadruplex von AIR-3A bestimmbar. Darüber hinaus wären weitere Experimente zur RNA-Fragmentierung eines UV-XL-Produktes von AIR-3A und hIL-6R hilfreich, um bindende Nukleotide genauer zu bestimmen. Hierfür kann das Fragmentierungsexperiment alternativ mit 3'-terminal anstelle von 5'-terminal markierter RNA durchgeführt werden, um hIL-6R bindende Nukleotide nahe des 3'-Terminus zu ermitteln. Die Fragmentierung mit weiteren Ribonukleasen, z. B. RNase T1 (nach G) oder RNase U2 (nach A), wäre ebenso möglich, wie auch Terbium-katalysierte Fragmentierungen anstelle der in dieser Arbeit verwendeten Fragmentierungen durch RNase A oder Imidazol. Darüber hinaus wäre das Etablieren von UV-XL-Methoden mit photoreaktiven Nukleobasenanaloga sinnvoll, da hiermit die Position der reagierenden Nukleoside eingegrenzt werden kann [207-209].

Für die MS-Analyse von Peptiden nach enzymatischer Proteolyse könnte alternativ zu Trypsin auch Chymotrypsin oder eine Kombination beider Enzyme verwendet werden, um eine höhere Sequenzabdeckung im *peptide mass fingerprint* zu gewährleisten und die bereits gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen. Eine stärkere Eingrenzung der in die Aptamerbindung involvierten Aminosäuren von hIL-6R kann zudem über eine Aufarbeitung des UV-XL-Produktes gemäß der Methode der Arbeitsgruppe von Prof. H. Urlaub erhalten werden. Hierbei schliesse sich an die kovalente Verknüpfung eine enzymatische Proteolyse und Nukleolyse an. Nach Anreicherung von Nukleosid-bindenden Peptiden erfolgte eine Datenbank gestützte massenspektrometrische Analyse dieser Fragmente [207, 210].

Kristallisation von AIR-3A und Co-Kristallisation von AIR-3A und hIL-6R würden die eindeutige Aufklärung der molekularen Struktur des RNA-Aptamers und seiner Interaktion mit dem Rezeptorprotein liefern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Versuche hierzu durchgeführt, die jedoch nicht zu Kristallen mit hinreichender Streuung von Röntgenstrahlung führten. Der Anspruch, der an die Expertise auf diesem Gebiet gestellt wird, ist durch die

## AUSBLICK

geringe Anzahl an entsprechenden Arbeiten dokumentiert [200, 303]. Bisher sind von RNA-Quadruplexen im Gegensatz zu DNA-Quadruplexen relativ wenige Strukturen über Kristallographie gelöst worden, viele davon erst in den vergangenen drei Jahren (Stand Aug. 2014 gab es in der PDB 19 Kristallstrukturen von RNA-Quadruplexen, dagegen waren 69 Kristallstrukturen von DNA-Komplexen veröffentlicht worden). Ebenso ist nur eine Minderheit der veröffentlichten atomaren Strukturen von RNA-Protein-Komplexen aus Co-Kristallisation hervorgegangen (13%, Stand Juni 2013 [201]). Eine Alternative böte die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie [304], mit deren Hilfe auch der Faltungsvorgang aufgeklärt werden könnte, sowie die Frage, ob AIR-3A in Lösung monomer, dimer oder sogar tetramer vorliegt.

## 8 LITERATUR

1. Ellington, AD, and Szostak, JW (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.
2. Tuerk, C, and Gold, L (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505-510.
3. Cho, EJ, Lee, JW, and Ellington, AD (2009). Applications of aptamers as sensors. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **2**: 241-264.
4. Bunka, DH, and Stockley, PG (2006). Aptamers come of age - at last. *Nature reviews Microbiology* **4**: 588-596.
5. Levy-Nissenbaum, E, Radovic-Moreno, AF, Wang, AZ, Langer, R, and Farokhzad, OC (2008). Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery. *Trends in biotechnology* **26**: 442-449.
6. Meyer, C, Hahn, U, and Rentmeister, A (2011). Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *Journal of nucleic acids* **2011**: 904750.
7. Keefe, AD, Pai, S, and Ellington, A (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* **9**: 537-550.
8. Meyer, C, *et al.* (2014). Stabilized Interleukin-6 receptor binding RNA aptamers. *RNA biology* **11**: 57-65.
9. Lupold, SE, Hicke, BJ, Lin, Y, and Coffey, DS (2002). Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer research* **62**: 4029-4033.
10. Helmling, S, *et al.* (2004). Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13174-13179.
11. Rajendran, M, and Ellington, AD (2008). Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc. *Analytical and bioanalytical chemistry* **390**: 1067-1075.
12. Holeman, LA, Robinson, SL, Szostak, JW, and Wilson, C (1998). Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Folding & design* **3**: 423-431.
13. Mannironi, C, Scerch, C, Fruscoloni, P, and Tocchini-Valentini, GP (2000). Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: the evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif. *RNA* **6**: 520-527.
14. Raddatz, MS, Dolf, A, Endl, E, Knolle, P, Famulok, M, and Mayer, G (2008). Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 5190-5193.
15. Shanguan, D, *et al.* (2006). 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* **103**: 11838-11843.

## LITERATUR

16. Mascini, M (2008). Aptamers and their applications. *Analytical and bioanalytical chemistry* **390**: 987-988.
17. Birch, JR, and Racher, AJ (2006). Antibody production. *Advanced drug delivery reviews* **58**: 671-685.
18. Jayasena, SD (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* **45**: 1628-1650.
19. Hwang, SY, *et al.* (2012). 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic acids research* **40**: 2724-2733.
20. Seth, RB, Sun, L, and Chen, ZJ (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell research* **16**: 141-147.
21. Ireson, CR, and Kelland, LR (2006). Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular cancer therapeutics* **5**: 2957-2962.
22. Eyetech-Study-Group (2002). Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* **22**: 143-152.
23. Eyetech-Study-Group (2003). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* **110**: 979-986.
24. Liu, J, and Stormo, GD (2005). Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions. *Nucleic acids research* **33**: e141.
25. Mayer, G, and Hover, T (2009). In vitro selection of ssDNA aptamers using biotinylated target proteins. *Methods Mol Biol* **535**: 19-32.
26. Mayer, G, Ahmed, MS, Dolf, A, Endl, E, Knolle, PA, and Famulok, M (2010). Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nature protocols* **5**: 1993-2004.
27. Thiel, WH, *et al.* (2012). Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection. *PloS one* **7**: e43836.
28. Thiel, KW, *et al.* (2012). Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2+-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic acids research* **40**: 6319-6337.
29. Hernandez, LI, Flenker, KS, Hernandez, FJ, Klingelutz, AJ, McNamara, JO, 2nd, and Giangrande, PH (2013). Methods for Evaluating Cell-Specific, Cell-Internalizing RNA Aptamers. *Pharmaceuticals (Basel)* **6**: 295-319.
30. Mi, J, *et al.* (2010). In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nature chemical biology* **6**: 22-24.
31. Cheng, C, Chen, YH, Lennox, KA, Behlke, MA, and Davidson, BL (2013). In vivo SELEX for Identification of Brain-penetrating Aptamers. *Molecular therapy Nucleic acids* **2**: e67.
32. Wilson, R, Bourne, C, Chaudhuri, RR, Gregory, R, Kenny, J, and Cossins, A (2014). Single-step selection of bivalent aptamers validated by comparison with SELEX using high-throughput sequencing. *PloS one* **9**: e100572.

## LITERATUR

33. Schutze, T, *et al.* (2011). Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS one* **6**: e29604.
34. MacPherson, IS, *et al.* (2011). Multivalent glycocluster design through directed evolution. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 11238-11242.
35. Lim, EK, *et al.* (2013). Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin  $\alpha v \beta 3$  via magnetic resonance imaging. *Journal of biomedical materials research Part A*.
36. Kraemer, S, *et al.* (2011). From SOMAmer-based biomarker discovery to diagnostic and clinical applications: a SOMAmer-based, streamlined multiplex proteomic assay. *PLoS one* **6**: e26332.
37. Park, NJ, *et al.* (2013). Measurement of cetuximab and panitumumab-unbound serum EGFR extracellular domain using an assay based on slow off-rate modified aptamer (SOMAmer) reagents. *PLoS one* **8**: e71703.
38. Bock, LC, Griffin, LC, Latham, JA, Vermaas, EH, and Toole, JJ (1992). Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**: 564-566.
39. Gilbert, JC, *et al.* (2007). First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation* **116**: 2678-2686.
40. Lundblad, RL, Bradshaw, RA, Gabriel, D, Ortel, TL, Lawson, J, and Mann, KG (2004). A review of the therapeutic uses of thrombin. *Thrombosis and haemostasis* **91**: 851-860.
41. Sheehan, JP, and Phan, TM (2001). Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex by an allosteric mechanism. *Biochemistry* **40**: 4980-4989.
42. Sheehan, JP, and Lan, HC (1998). Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood* **92**: 1617-1625.
43. Gragoudas, ES, Adamis, AP, Cunningham, ET, Jr., Feinsod, M, and Guyer, DR (2004). Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **351**: 2805-2816.
44. Ng, EW, Shima, DT, Calias, P, Cunningham, ET, Jr., Guyer, DR, and Adamis, AP (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature reviews Drug discovery* **5**: 123-132.
45. U.S. National Institutes of Health; <http://clinicaltrials.gov>; Stand: Sep.2014.
46. Chakravarthy, U, *et al.* (2006). Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **113**: 1508 e1501-1525.
47. Vavalle, JP, and Cohen, MG (2012). The REG1 anticoagulation system: a novel actively controlled factor IX inhibitor using RNA aptamer technology for treatment of acute coronary syndrome. *Future cardiology* **8**: 371-382.
48. Povsic, TJ, *et al.* (2014). Use of the REG1 anticoagulation system in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: results from the phase II RADAR-PCI study. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in*

- collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology.*
49. Mitchell, TS, Bradley, J, Robinson, GS, Shima, DT, and Ng, YS (2008). RGS5 expression is a quantitative measure of pericyte coverage of blood vessels. *Angiogenesis* **11**: 141-151.
  50. Zavyalova, E, Golovin, A, Pavlova, G, and Kopylov, A (2013). Module-activity relationship of G-quadruplex based DNA aptamers for human thrombin. *Current medicinal chemistry* **20**: 4836-4843.
  51. Hoellenriegel, J, *et al.* (2014). The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **123**: 1032-1039.
  52. Kulkarni, O, *et al.* (2007). Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**: 2350-2358.
  53. Spiel, AO, *et al.* (2009). The aptamer ARC1779 is a potent and specific inhibitor of von Willebrand Factor mediated ex vivo platelet function in acute myocardial infarction. *Platelets* **20**: 334-340.
  54. Markus, HS, McCollum, C, Imray, C, Goulder, MA, Gilbert, J, and King, A (2011). The von Willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **42**: 2149-2153.
  55. Rosenberg, JE, *et al.* (2014). A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Investigational new drugs* **32**: 178-187.
  56. Bates, PJ (1999). Antiproliferative Activity of G-rich Oligonucleotides Correlates with Protein Binding. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 26369-26377.
  57. Bates, PJ, Laber, DA, Miller, DM, Thomas, SD, and Trent, JO (2009). Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Experimental and molecular pathology* **86**: 151-164.
  58. Ni, Z, and Hui, P (2009). Emerging pharmacologic therapies for wet age-related macular degeneration. *Ophthalmologica Journal internationale d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde* **223**: 401-410.
  59. Yin, J, *et al.* (2013). Label-free and turn-on aptamer strategy for cancer cells detection based on a DNA-silver nanocluster fluorescence upon recognition-induced hybridization. *Analytical chemistry* **85**: 12011-12019.
  60. Estevez, MC, *et al.* (2010). Nanoparticle-aptamer conjugates for cancer cell targeting and detection. *Methods Mol Biol* **624**: 235-248.
  61. Zheng, T, Zhang, Q, Feng, S, Zhu, JJ, Wang, Q, and Wang, H (2014). Robust nonenzymatic hybrid nanoelectrocatalysts for signal amplification toward ultrasensitive electrochemical cytosensing. *Journal of the American Chemical Society* **136**: 2288-2291.

## LITERATUR

62. Mayer, G (2009). The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 2672-2689.
63. Vester, B, and Wengel, J (2004). LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* **43**: 13233-13241.
64. Goodman, OB, Jr., et al. (2007). Interaction of prostate specific membrane antigen with clathrin and the adaptor protein complex-2. *Int J Oncol* **31**: 1199-1203.
65. Gorden, P, Carpentier, JL, Cohen, S, and Orci, L (1978). Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 5025-5029.
66. Hanover, JA, Willingham, MC, and Pastan, I (1984). Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin-coated membranes. *Cell* **39**: 283-293.
67. Iacopetta, BJ, Rothenberger, S, and Kuhn, LC (1988). A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell* **54**: 485-489.
68. Maxfield, FR, and McGraw, TE (2004). Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 121-132.
69. Liu, HY, and Gao, X (2013). A universal protein tag for delivery of SiRNA-aptamer chimeras. *Scientific reports* **3**: 3129.
70. Verma, UN, et al. (1999). Paclitaxel vs cyclophosphamide in peripheral blood stem cell mobilization: comparative studies in a murine model. *Experimental hematology* **27**: 553-560.
71. Kichler, A, Mason, AJ, and Bechinger, B (2006). Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochimica et biophysica acta* **1758**: 301-307.
72. Berg, K, et al. (1999). Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research* **59**: 1180-1183.
73. Dominska, M, and Dykxhoorn, DM (2010). Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *Journal of cell science* **123**: 1183-1189.
74. Burnett, JC, Rossi, JJ, and Tiemann, K (2011). Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnology journal* **6**: 1130-1146.
75. Chu, TC, Twu, KY, Ellington, AD, and Levy, M (2006). Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic acids research* **34**: e73.
76. Dassie, JP, et al. (2009). Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nature biotechnology* **27**: 839-849.
77. McNamara, JO, 2nd, et al. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nature biotechnology* **24**: 1005-1015.
78. Wullner, U, Neef, I, Eller, A, Kleines, M, Tur, MK, and Barth, S (2008). Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. *Current cancer drug targets* **8**: 554-565.

## LITERATUR

79. Zhou, J, *et al.* (2009). Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic acids research* **37**: 3094-3109.
80. Zhou, J, *et al.* (2013). Dual functional BAFF receptor aptamers inhibit ligand-induced proliferation and deliver siRNAs to NHL cells. *Nucleic acids research* **41**: 4266-4283.
81. He, L, and Hannon, GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews Genetics* **5**: 522-531.
82. Esposito, CL, *et al.* (2014). Multifunctional Aptamer-miRNA Conjugates for Targeted Cancer Therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*.
83. Zhang, P, *et al.* (2014). DNA-hybrid-gated multifunctional mesoporous silica nanocarriers for dual-targeted and microRNA-responsive controlled drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**: 2371-2375.
84. Boyacioglu, O, Stuart, CH, Kulik, G, and Gmeiner, WH (2013). Dimeric DNA Aptamer Complexes for High-capacity-targeted Drug Delivery Using pH-sensitive Covalent Linkages. *Molecular therapy Nucleic acids* **2**: e107.
85. Huang, YF, *et al.* (2009). Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **10**: 862-868.
86. Lale, SV, R, GA, Aravind, A, Kumar, DS, and Koul, V (2014). AS1411 Aptamer and Folic Acid Functionalized pH-Responsive ATRP Fabricated pPEGMA-PCL-pPEGMA Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules*.
87. Savla, R, Taratula, O, Garbuzenko, O, and Minko, T (2011). Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **153**: 16-22.
88. Huang, YF, Sefah, K, Bamrungsap, S, Chang, HT, and Tan, W (2008). Selective photothermal therapy for mixed cancer cells using aptamer-conjugated nanorods. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **24**: 11860-11865.
89. Kang, H, O'Donoghue, MB, Liu, H, and Tan, W (2010). A liposome-based nanostructure for aptamer directed delivery. *Chem Commun (Camb)* **46**: 249-251.
90. Xiao, Z, and Farokhzad, OC (2012). Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS nano* **6**: 3670-3676.
91. Lee, IH, An, S, Yu, MK, Kwon, HK, Im, SH, and Jon, S (2011). Targeted chemoimmunotherapy using drug-loaded aptamer-dendrimer bioconjugates. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **155**: 435-441.
92. Kim, E, *et al.* (2010). Prostate cancer cell death produced by the co-delivery of Bcl-xL shRNA and doxorubicin using an aptamer-conjugated polyplex. *Biomaterials* **31**: 4592-4599.

## LITERATUR

93. Bagalkot, V, and Gao, X (2011). siRNA-aptamer chimeras on nanoparticles: preserving targeting functionality for effective gene silencing. *ACS nano* **5**: 8131-8139.
94. Chang, M, Yang, CS, and Huang, DM (2011). Aptamer-conjugated DNA icosahedral nanoparticles as a carrier of doxorubicin for cancer therapy. *ACS nano* **5**: 6156-6163.
95. Zhu, G, *et al.* (2013). Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 7998-8003.
96. Zhao, N, You, J, Zeng, Z, Li, C, and Zu, Y (2013). An ultra pH-sensitive and aptamer-equipped nanoscale drug-delivery system for selective killing of tumor cells. *Small* **9**: 3477-3484.
97. Zhang, L, *et al.* (2007). Co-delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs from nanoparticle-aptamer bioconjugates. *ChemMedChem* **2**: 1268-1271.
98. Cheng, J, *et al.* (2007). Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* **28**: 869-876.
99. Farokhzad, OC, *et al.* (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 6315-6320.
100. Tong, R, Yala, L, Fan, TM, and Cheng, J (2010). The formulation of aptamer-coated paclitaxel-poly lactide nanoconjugates and their targeting to cancer cells. *Biomaterials* **31**: 3043-3053.
101. Gu, F, *et al.* (2008). Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2586-2591.
102. Dhar, S, Gu, FX, Langer, R, Farokhzad, OC, and Lippard, SJ (2008). Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17356-17361.
103. Wang, AZ, *et al.* (2008). Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy. *ChemMedChem* **3**: 1311-1315.
104. Bagalkot, V, *et al.* (2007). Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano letters* **7**: 3065-3070.
105. Bagalkot, V, Farokhzad, OC, Langer, R, and Jon, S (2006). An Aptamer–Doxorubicin Physical Conjugate as a Novel Targeted Drug-Delivery Platform. *Angewandte Chemie* **118**: 8329-8332.
106. Min, K, *et al.* (2011). Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers. *Biomaterials* **32**: 2124-2132.
107. Zhao, Y, *et al.* (2012). Prodrug strategy for PSMA-targeted delivery of TGX-221 to prostate cancer cells. *Molecular pharmaceutics* **9**: 1705-1716.

## LITERATUR

108. Pastor, F, Kolonias, D, Giangrande, PH, and Gilboa, E (2010). Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **465**: 227-230.
109. Ni, X, *et al.* (2011). Prostate-targeted radiosensitization via aptamer-shRNA chimeras in human tumor xenografts. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2383-2390.
110. Wu, X, *et al.* (2011). Second-generation aptamer-conjugated PSMA-targeted delivery system for prostate cancer therapy. *International journal of nanomedicine* **6**: 1747-1756.
111. Chu, TC, *et al.* (2006). Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer research* **66**: 5989-5992.
112. Taghdisi, SM, Abnous, K, Mosaffa, F, and Behravan, J (2010). Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer. *Journal of drug targeting* **18**: 277-281.
113. Wang, J, *et al.* (2013). Photosensitizer-gold nanorod composite for targeted multimodal therapy. *Small* **9**: 3678-3684.
114. Huang, YF, Chang, HT, and Tan, W (2008). Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. *Analytical chemistry* **80**: 567-572.
115. Tong, GJ, Hsiao, SC, Carrico, ZM, and Francis, MB (2009). Viral capsid DNA aptamer conjugates as multivalent cell-targeting vehicles. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 11174-11178.
116. Chen, T, *et al.* (2011). Smart multifunctional nanostructure for targeted cancer chemotherapy and magnetic resonance imaging. *ACS nano* **5**: 7866-7873.
117. He, X, Hai, L, Su, J, Wang, K, and Wu, X (2011). One-pot synthesis of sustained-released doxorubicin silica nanoparticles for aptamer targeted delivery to tumor cells. *Nanoscale* **3**: 2936-2942.
118. Douglas, SM, Bachelet, I, and Church, GM (2012). A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* **335**: 831-834.
119. Ray, P, *et al.* (2012). Aptamer-mediated delivery of chemotherapy to pancreatic cancer cells. *Nucleic acid therapeutics* **22**: 295-305.
120. Li, N, Larson, T, Nguyen, HH, Sokolov, KV, and Ellington, AD (2010). Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells. *Chem Commun (Camb)* **46**: 392-394.
121. Hernandez, FJ, Hernandez, LI, Pinto, A, Schafer, T, and Ozalp, VC (2013). Targeting cancer cells with controlled release nanocapsules based on a single aptamer. *Chem Commun (Camb)* **49**: 1285-1287.
122. Aravind, A, *et al.* (2012). AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery. *Biotechnology and bioengineering* **109**: 2920-2931.
123. Gao, H, *et al.* (2012). Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles. *Biomaterials* **33**: 5115-5123.
124. Charoenphol, P, and Bermudez, H (2014). Aptamer-targeted DNA nanostructures for therapeutic delivery. *Molecular pharmaceuticals*.

## LITERATUR

125. Shieh, YA, Yang, SJ, Wei, MF, and Shieh, MJ (2010). Aptamer-based tumor-targeted drug delivery for photodynamic therapy. *ACS nano* **4**: 1433-1442.
126. Hwang do, W, *et al.* (2010). A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **51**: 98-105.
127. Li, L, *et al.* (2014). Nucleolin-targeting liposomes guided by aptamer AS1411 for the delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas. *Biomaterials* **35**: 3840-3850.
128. Li, J, *et al.* (2014). Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: preliminary assessment in lung cancer. *Nuclear medicine and biology* **41**: 179-185.
129. Kim, JK, Choi, KJ, Lee, M, Jo, MH, and Kim, S (2012). Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle. *Biomaterials* **33**: 207-217.
130. Wilner, SE, *et al.* (2012). An RNA alternative to human transferrin: a new tool for targeting human cells. *Molecular therapy Nucleic acids* **1**: e21.
131. Chen, CH, *et al.* (2008). Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15908-15913.
132. Zhang, MZ, Yu, RN, Chen, J, Ma, ZY, and Zhao, YD (2012). Targeted quantum dots fluorescence probes functionalized with aptamer and peptide for transferrin receptor on tumor cells. *Nanotechnology* **23**: 485104.
133. Hu, Y, Duan, J, Zhan, Q, Wang, F, Lu, X, and Yang, XD (2012). Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells in vitro. *PloS one* **7**: e31970.
134. Ferreira, CS, Cheung, MC, Missailidis, S, Bisland, S, and Garipey, J (2009). Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells. *Nucleic acids research* **37**: 866-876.
135. Bruno, JG (2010). Aptamer-biotin-streptavidin-C1q complexes can trigger the classical complement pathway to kill cancer cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal* **46**: 107-113.
136. Stecker, JR, Savage, AA, Bruno, JG, Garcia, DM, and Koke, JR (2012). Dynamics and visualization of MCF7 adenocarcinoma cell death by aptamer-C1q-mediated membrane attack. *Nucleic acid therapeutics* **22**: 275-282.
137. Borbas, KE, Ferreira, CS, Perkins, A, Bruce, JI, and Missailidis, S (2007). Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *Bioconjugate chemistry* **18**: 1205-1212.
138. Yu, C, *et al.* (2011). Novel aptamer-nanoparticle bioconjugates enhances delivery of anticancer drug to MUC1-positive cancer cells in vitro. *PloS one* **6**: e24077.
139. Dai, F, Zhang, Y, Zhu, X, Shan, N, and Chen, Y (2012). Anticancer role of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of PTEN methylation. *Targeted oncology* **7**: 217-225.

## LITERATUR

140. Dai, F, Zhang, Y, Zhu, X, Shan, N, and Chen, Y (2013). The anti-chemoresistant effect and mechanism of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **131**: 451-459.
141. Liu, N, Zhou, C, Zhao, J, and Chen, Y (2012). Reversal of paclitaxel resistance in epithelial ovarian carcinoma cells by a MUC1 aptamer-let-7i chimera. *Cancer investigation* **30**: 577-582.
142. Zhou, J, Li, H, Li, S, Zaia, J, and Rossi, JJ (2008). Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **16**: 1481-1489.
143. Neff, CP, *et al.* (2011). An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Science translational medicine* **3**: 66ra66.
144. Hicke, BJ, *et al.* (2006). Tumor targeting by an aptamer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **47**: 668-678.
145. Zhao, N, Bagaria, HG, Wong, MS, and Zu, Y (2011). A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *Journal of nanobiotechnology* **9**: 2.
146. Hussain, AF, Tur, MK, and Barth, S (2013). An aptamer-siRNA chimera silences the eukaryotic elongation factor 2 gene and induces apoptosis in cancers expressing alphavbeta3 integrin. *Nucleic acid therapeutics* **23**: 203-212.
147. Nishimoto, N, and Kishimoto, T (2006). Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature clinical practice Rheumatology* **2**: 619-626.
148. Rincon, M (2012). Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in immunology* **33**: 571-577.
149. Bork, P, Holm, L, and Sander, C (1994). The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of molecular biology* **242**: 309-320.
150. Vollmer., P, Oppmann., B, Voltz., N, Fischer., M, and Rose-John, S (1999). A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. *European Journal of Biochemistry* **263**: 438-446.
151. Varghese, JN, *et al.* (2002). Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15959-15964.
152. Gelinas, AD, *et al.* (2014). Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic Acid ligand. *The Journal of biological chemistry* **289**: 8720-8734.
153. Leahy, DJ, Hendrickson, WA, Aukhil, I, and Erickson, HP (1992). Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**: 987-991.
154. Silver, JS, and Hunter, CA (2010). gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *Journal of leukocyte biology* **88**: 1145-1156.

## LITERATUR

155. Heinrich, PC, Behrmann, I, Haan, S, Hermanns, HM, Muller-Newen, G, and Schaper, F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**: 1-20.
156. Jones, SA, Horiuchi, S, Topley, N, Yamamoto, N, and Fuller, GM (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 43-58.
157. Fischer, M, *et al.* (1997). I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology* **15**: 142-145.
158. Febbraio, MA, Rose-John, S, and Pedersen, BK (2010). Is interleukin-6 receptor blockade the Holy Grail for inflammatory diseases? *Clinical pharmacology and therapeutics* **87**: 396-398.
159. Carbone, G, Wilson, A, Diehl, SA, Bunn, J, Cooper, SM, and Rincon, M (2013). Interleukin-6 receptor blockade selectively reduces IL-21 production by CD4 T cells and IgG4 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *International journal of biological sciences* **9**: 279-288.
160. van Rhee, F, *et al.* (2014). Siltuximab for multicentric Castleman's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology* **15**: 966-974.
161. Inoue, K, *et al.* (1994). Expression of the interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130 genes in acute leukemia. *Blood* **84**: 2672-2680.
162. Schneider, A, *et al.* (2013). In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Science translational medicine* **5**: 170ra115.
163. Gupta, S, *et al.* (2014). Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *The Journal of biological chemistry* **289**: 8706-8719.
164. Maitra, A, *et al.* (2007). Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 7506-7511.
165. Doble, R, McDermott, MF, Cesur, O, Stonehouse, NJ, and Wittmann, M (2014). IL-17A RNA aptamer: possible therapeutic potential in some cells, more than we bargained for in others? *The Journal of investigative dermatology* **134**: 852-855.
166. Chen, L, *et al.* (2011). IL-17RA aptamer-mediated repression of IL-6 inhibits synovium inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **19**: 711-718.
167. Meyer, C (2009). Interleukin-6-Rezeptor spezifische RNA-Aptamere. In *Chemistry, Institute for biochemistry and molecular biology*, p. 127. University of Hamburg, Hamburg.
168. Meyer, C, *et al.* (2012). Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells. *RNA biology* **9**: 67-80.

## LITERATUR

169. Eydeler, K (2011). Charakterisierung von RNA-Aptameren mit Spezifität für den humanen Interleukin-6-Rezeptor. In *Chemistry, Institute for biochemistry and molecular biology*, p. 163. University of Hamburg, Hamburg.
170. Murat, P, and Balasubramanian, S (2014). Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA. *Current opinion in genetics & development* **25**: 22-29.
171. Millevoi, S, Moine, H, and Vagner, S (2012). G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **3**: 495-507.
172. Bugaut, A, and Balasubramanian, S (2012). 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic acids research* **40**: 4727-4741.
173. Josefsen, LB, and Boyle, RW (2012). Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* **2**: 916-966.
174. Coupienne, I, Fettweis, G, Rubio, N, Agostinis, P, and Piette, J (2011). 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **10**: 1868-1878.
175. Fabris, C, *et al.* (2001). Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research* **61**: 7495-7500.
176. Moan, J, and Berg, K (1991). The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology* **53**: 549-553.
177. Cunderlikova, B, Gangeskar, L, and Moan, J (1999). Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **53**: 81-90.
178. Villanueva, A, Canete, M, and Hazen, MJ (1989). Uptake and DNA photodamage induced in plant cells in vivo by two cationic porphyrins. *Mutagenesis* **4**: 157-159.
179. Villanueva, A, and Jori, G (1993). Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4N-methylpyridyl)porphine. *Cancer letters* **73**: 59-64.
180. Mallikaratchy, P, Tang, Z, and Tan, W (2008). Cell specific aptamer-photosensitizer conjugates as a molecular tool in photodynamic therapy. *ChemMedChem* **3**: 425-428.
181. Han, D, *et al.* (2013). Engineering a cell-surface aptamer circuit for targeted and amplified photodynamic cancer therapy. *ACS nano* **7**: 2312-2319.
182. Gijssens, A, *et al.* (2002). Targeting of the photocytotoxic compound AIPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. *International journal of cancer Journal international du cancer* **101**: 78-85.
183. Derycke, AS, *et al.* (2004). Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AIPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* **96**: 1620-1630.
184. Oseroff, AR, Ohuoha, D, Hasan, T, Bommer, JC, and Yarmush, ML (1986). Antibody-targeted photolysis: selective photodestruction of human T-cell leukemia cells using

- monoclonal antibody-chlorin e6 conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 8744-8748.
185. Rakestraw, SL, Tompkins, RG, and Yarmush, ML (1990). Antibody-targeted photolysis: in vitro studies with Sn(IV) chlorin e6 covalently bound to monoclonal antibodies using a modified dextran carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4217-4221.
  186. Rakestraw, SL, Tompkins, RG, and Yarmush, ML (1990). Preparation and characterization of immunoconjugates for antibody-targeted photolysis. *Bioconjugate chemistry* **1**: 212-221.
  187. Cihlar, T, and Ray, AS (2010). Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral research* **85**: 39-58.
  188. Opio, CK, Lee, WM, and Kirkpatrick, P (2005). Entecavir. *Nature reviews Drug discovery* **4**: 535-536.
  189. Keam, SJ, Chapman, TM, and Figgitt, DP (2004). Brivudin (bromovinyl deoxyuridine). *Drugs* **64**: 2091-2097; discussion 2098-2099.
  190. Galmarini, CM, Mackey, JR, and Dumontet, C (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The Lancet Oncology* **3**: 415-424.
  191. Longley, DB, Harkin, DP, and Johnston, PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews Cancer* **3**: 330-338.
  192. Maybaum, J, Ullman, B, Mandel, HG, Day, JL, and Sadee, W (1980). Regulation of RNA- and DNA-directed actions of 5-fluoropyrimidines in mouse T-lymphoma (S-49) cells. *Cancer research* **40**: 4209-4215.
  193. Kunz, C, *et al.* (2009). Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS biology* **7**: e91.
  194. Gmeiner, WH (2005). Novel chemical strategies for thymidylate synthase inhibition. *Current medicinal chemistry* **12**: 191-202.
  195. Pinedo, HM, and Peters, GF (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **6**: 1653-1664.
  196. Malet-Martino, M, Jolimaitre, P, and Martino, R (2002). The prodrugs of 5-fluorouracil. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* **2**: 267-310.
  197. Burke, CW, Alexander, Et, Timbie, K, Kilbanov, AL, and Price, RJ (2014). Ultrasound-activated agents comprised of 5FU-bearing nanoparticles bonded to microbubbles inhibit solid tumor growth and improve survival. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **22**: 321-328.
  198. Jennings-Gee, J, Pardee, TS, and Gmeiner, WH (2013). Replication-dependent irreversible topoisomerase 1 poisoning is responsible for FdUMP[10] anti-leukemic activity. *Experimental hematology* **41**: 180-188 e184.
  199. Wu, SY, Chen, TM, Gmeiner, WH, Chu, E, and Schmitz, JC (2013). Development of modified siRNA molecules incorporating 5-fluoro-2'-deoxyuridine residues to enhance cytotoxicity. *Nucleic acids research* **41**: 4650-4659.

## LITERATUR

200. Ruigrok, VJ, Levisson, M, Hekelaar, J, Smidt, H, Dijkstra, BW, and van der Oost, J (2012). Characterization of Aptamer-Protein Complexes by X-ray Crystallography and Alternative Approaches. *International journal of molecular sciences* **13**: 10537-10552.
201. Carlomagno, T (2014). Present and future of NMR for RNA-protein complexes: a perspective of integrated structural biology. *J Magn Reson* **241**: 126-136.
202. Frank, J (2001). Cryo-electron microscopy as an investigative tool: the ribosome as an example. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **23**: 725-732.
203. Schiemann, O, Piton, N, Plackmeyer, J, Bode, BE, Prisner, TF, and Engels, JW (2007). Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxide TPA and use of PELDOR, a pulse EPR method, to measure intramolecular distances. *Nature protocols* **2**: 904-923.
204. Schiemann, O, and Prisner, TF (2007). Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy. *Quarterly reviews of biophysics* **40**: 1-53.
205. Walter, NG (2001). Structural dynamics of catalytic RNA highlighted by fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25**: 19-30.
206. Klostermeier, D, and Millar, DP (2001). RNA conformation and folding studied with fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **23**: 240-254.
207. Christian, H, Hofele, RV, Urlaub, H, and Ficner, R (2014). Insights into the activation of the helicase Prp43 by biochemical studies and structural mass spectrometry. *Nucleic acids research* **42**: 1162-1179.
208. Bley, CJ, Qi, X, Rand, DP, Borges, CR, Nelson, RW, and Chen, JJ (2011). RNA-protein binding interface in the telomerase ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 20333-20338.
209. Meisenheimer, KM, and Koch, TH (1997). Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **32**: 101-140.
210. Bhaskar, V, *et al.* (2013). Structure and RNA-binding properties of the Not1-Not2-Not5 module of the yeast Ccr4-Not complex. *Nature structural & molecular biology* **20**: 1281-1288.
211. Belyavsky, AV, Bavykin, SG, Gogvadze, EG, and Mirzabekov, AD (1980). Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA 175 and 165 base-pairs long. *Journal of molecular biology* **139**: 519-536.
212. Ule, J, Jensen, KB, Ruggiu, M, Mele, A, Ule, A, and Darnell, RB (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**: 1212-1215.
213. Brewer, LA, Goelz, S, and Noller, HF (1983). Ribonucleic acid-protein cross-linking within the intact Escherichia coli ribosome, utilizing ethylene glycol bis[3-(2-ketobutyraldehyde) ether], a reversible, bifunctional reagent: synthesis and cross-linking within 30S and 50S subunits. *Biochemistry* **22**: 4303-4309.
214. Baranov, PV, Sergiev, PV, Dontsova, OA, Bogdanov, AA, and Brimacombe, R (1998). The Database of Ribosomal Cross links (DRC). *Nucleic acids research* **26**: 187-189.

## LITERATUR

215. Kuhn-Holsken, E, Lenz, C, Sander, B, Luhrmann, R, and Urlaub, H (2005). Complete MALDI-ToF MS analysis of cross-linked peptide-RNA oligonucleotides derived from nonlabeled UV-irradiated ribonucleoprotein particles. *RNA* **11**: 1915-1930.
216. Shetlar, MD, Christensen, J, and Hom, K (1984). Photochemical addition of amino acids and peptides to DNA. *Photochemistry and photobiology* **39**: 125-133.
217. Saito, I, and Sugiyama, H (1990). Photoreactions of Nucleic Acids and Their Constituents with Amino Acids and Related Compounds. . In: Morrison, H (ed). *Bioorganic Photochemistry (Vol 1 Photochemistry of the Nucleic Acids)*, vol. 1. John Wiley & Sons: New York.
218. Smith, KC (1969). Photochemical addition of amino acids to <sup>14</sup>C-uracil. *Biochemical and biophysical research communications* **34**: 354-357.
219. Shetlar, MD, Hom, K, and Venditto, VJ (2013). Photohydrate-mediated reactions of uridine, 2'-deoxyuridine and 2'-deoxycytidine with amines at near neutral pH. *Photochemistry and photobiology* **89**: 869-877.
220. Saito, I, and Matsuura, T (1985). Chemical Aspects of UV-Induced Cross-Linking of Proteins to Nucleic Acids. Photoreactions with Lysine and Tryptophan. *Accounts of Chemical Research* **18**: 134-141.
221. Smith, KC, and Aplin, RT (1966). A mixed photoproduct of uracil and cysteine (5-S-cysteine-6-hydrouracil). A possible model for the in vivo cross-linking of deoxyribonucleic acid and protein by ultraviolet light. *Biochemistry* **5**: 2125-2130.
222. Shaw, AA, Falick, AM, and Shetlar, MD (1992). Photoreactions of thymine and thymidine with N-acetyltyrosine. *Biochemistry* **31**: 10976-10983.
223. Burrows, CJ, and Muller, JG (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical reviews* **98**: 1109-1152.
224. Xu, X, Muller, JG, Ye, Y, and Burrows, CJ (2008). DNA-protein cross-links between guanine and lysine depend on the mechanism of oxidation for formation of C5 vs C8 guanosine adducts. *Journal of the American Chemical Society* **130**: 703-709.
225. Xu, X, Fleming, AM, Muller, JG, and Burrows, CJ (2008). Formation of Tricyclic [4.3.3.0] Adducts between 8-Oxoguanosine and Tyrosine under Conditions of Oxidative DNA-Protein Cross-Linking. *Journal of the American Chemical Society* **130**: 10080-10081.
226. De Bont, R, and van Larebeke, N (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**: 169-185.
227. Schreier, WJ, *et al.* (2007). Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science* **315**: 625-629.
228. Zachau, HG (1964). [Uv-Induced Uracil Dimerization in Soluble Ribonucleic Acid]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* **336**: 176-188.
229. Shetlar, MD, and Basus, VJ (2011). The photochemistry of uracil: a reinvestigation. *Photochemistry and photobiology* **87**: 82-102.
230. Updegrove, TB, Correia, JJ, Chen, Y, Terry, C, and Wartell, RM (2011). The stoichiometry of the Escherichia coli Hfq protein bound to RNA. *Rna* **17**: 489-500.

## LITERATUR

231. Yanagiya, A, Svitkin, YV, Shibata, S, Mikami, S, Imataka, H, and Sonenberg, N (2009). Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Molecular and cellular biology* **29**: 1661-1669.
232. Uckert, W, Wunderlich, V, Ghysdael, J, Portetelle, D, and Burny, A (1984). Bovine leukemia virus (BLV)--a structural model based on chemical crosslinking studies. *Virology* **133**: 386-392.
233. Thomson, AM, Rogers, JT, Walker, CE, Staton, JM, and Leedman, PJ (1999). Optimized RNA gel-shift and UV cross-linking assays for characterization of cytoplasmic RNA-protein interactions. *BioTechniques* **27**: 1032-1039, 1042.
234. Huthoff, H (2004). Evidence for a base triple in the free HIV-1 TAR RNA. *Rna* **10**: 412-423.
235. Urlaub, H, Hartmuth, K, Kostka, S, Grelle, G, and Luhrmann, R (2000). A general approach for identification of RNA-protein cross-linking sites within native human spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). Analysis of RNA-protein contacts in native U1 and U4/U6.U5 snRNPs. *The Journal of biological chemistry* **275**: 41458-41468.
236. Jones, S, Daley, DT, Luscombe, NM, Berman, HM, and Thornton, JM (2001). Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic acids research* **29**: 943-954.
237. Ellis, JJ, Broom, M, and Jones, S (2007). Protein-RNA interactions: structural analysis and functional classes. *Proteins* **66**: 903-911.
238. Treger, M, and Westhof, E (2001). Statistical analysis of atomic contacts at RNA-protein interfaces. *Journal of molecular recognition : JMR* **14**: 199-214.
239. Jeong, E, Kim, H, Lee, SW, and Han, K (2003). Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes. *Molecules and cells* **16**: 161-167.
240. Lejeune, D, Delsaux, N, Charlotiaux, B, Thomas, A, and Bresseur, R (2005). Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure. *Proteins* **61**: 258-271.
241. Luscombe, NM, Laskowski, RA, and Thornton, JM (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic acids research* **29**: 2860-2874.
242. Spriggs, RV, Murakami, Y, Nakamura, H, and Jones, S (2009). Protein function annotation from sequence: prediction of residues interacting with RNA. *Bioinformatics* **25**: 1492-1497.
243. Walia, RR, Xue, LC, Wilkins, K, El-Manzalawy, Y, Dobbs, D, and Honavar, V (2014). RNABindRPlus: a predictor that combines machine learning and sequence homology-based methods to improve the reliability of predicted RNA-binding residues in proteins. *PLoS one* **9**: e97725.
244. Murakami, Y, Spriggs, RV, Nakamura, H, and Jones, S (2010). PiRaNha: a server for the computational prediction of RNA-binding residues in protein sequences. *Nucleic acids research* **38**: W412-416.

## LITERATUR

245. Lewis, BA, *et al.* (2011). PRIDB: a Protein-RNA interface database. *Nucleic acids research* **39**: D277-282.
246. Jones, S (2014). PiRaNhA - web server for RNA binding site prediction, <http://www.bioinformatics.sussex.ac.uk/PIRANHA>.
247. Dobbs., D, and Honavar., V (2014). RNABindPlusR - A predictor for RNA-binding residues: <http://einstein.cs.iastate.edu/RNABindRPlus>; Predictor for RNA-binding interfaces: <http://pridb.qdcb.iastate.edu>.
248. Russo Krauss, I, Merlino, A, Randazzo, A, Novellino, E, Mazzarella, L, and Sica, F (2012). High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity. *Nucleic acids research* **40**: 8119-8128.
249. Huang, RH, Fremont, DH, Diener, JL, Schaub, RG, and Sadler, JE (2009). A structural explanation for the antithrombotic activity of ARC1172, a DNA aptamer that binds von Willebrand factor domain A1. *Structure* **17**: 1476-1484.
250. Huang, DB, Vu, D, Cassidy, LA, Zimmerman, JM, Maher, LJ, 3rd, and Ghosh, G (2003). Crystal structure of NF-kappaB (p50)<sub>2</sub> complexed to a high-affinity RNA aptamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9268-9273.
251. Moorthy, AK, Huang, DB, Wang, VY, Vu, D, and Ghosh, G (2007). X-ray structure of a NF-kappaB p50/RelB/DNA complex reveals assembly of multiple dimers on tandem kappaB sites. *Journal of molecular biology* **373**: 723-734.
252. Steinberg, TH (2009). Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods in enzymology* **463**: 541-563.
253. Giegé, R, Felden, B, Zenkova, MA, Sil'nikov, VN, and Vlassov, VV (2000). Cleavage of RNA with Synthetic Ribonuclease Mimics. In: Celander, DW and JN Abeleon eds). *Methods in Enzymology - RNA-Ligand Interactions, Part B: Molecular Biology Methods*, vol. 318. Academic Press: San Diego, CA, USA.
254. Cunderlikova, B, Bjorklund, EG, Pettersen, EO, and Moan, J (2001). pH-dependent spectral properties of HplX, TPPS2a, mTHPP and mTHPC. *Photochemistry and photobiology* **74**: 246-252.
255. Berg, K, Maziere, JC, Geze, M, and Santus, R (1998). Verapamil enhances the uptake and the photocytotoxic effect of PII, but not that of tetra(4-sulfonatophenyl)porphine. *Biochimica et biophysica acta* **1370**: 317-324.
256. Munoz-Pinedo, C, Oliver, FJ, and Lopez-Rivas, A (2001). Apoptosis of haematopoietic cells upon thymidylate synthase inhibition is independent of p53 accumulation and CD95-CD95 ligand interaction. *The Biochemical journal* **353**: 101-108.
257. Hiley, SL, Sood, VD, Fan, J, and Collins, RA (2002). 4-thio-U cross-linking identifies the active site of the VS ribozyme. *The EMBO journal* **21**: 4691-4698.
258. Koenig, T, *et al.* (2008). Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *Journal of proteome research* **7**: 3708-3717.

## LITERATUR

259. Inc, MS (2014). p. Mascot Server Database search for Peptide Mass Fingerprint; <http://www.matrixscience.com/cgi/>.
260. Li, BQ, Zhang, YC, Huang, GH, Cui, WR, Zhang, N, and Cai, YD (2014). Prediction of aptamer-target interacting pairs with pseudo-amino acid composition. *PLoS one* **9**: e86729.
261. Hoinka, J, Zotenko, E, Friedman, A, Sauna, ZE, and Przytycka, TM (2012). Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. *Bioinformatics* **28**: i215-223.
262. Rose-John, S, Scheller, J, Elson, G, and Jones, SA (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of leukocyte biology* **80**: 227-236.
263. Taga, T, Kawanishi, Y, Hardy, RR, Hirano, T, and Kishimoto, T (1987). Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *The Journal of experimental medicine* **166**: 967-981.
264. Groothuis, TA, and Reits, EA (2005). Monitoring the distribution and dynamics of proteasomes in living cells. *Methods in enzymology* **399**: 549-563.
265. Han, J, and Burgess, K (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chemical reviews* **110**: 2709-2728.
266. Dailey, ME, Manders, E, Soll, DR, and Terasaki, M (2006). Confocal Microscopy of Living Cells. In: Pawley, JB (ed). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. SpringerScience+Business Media: New York. pp 381-403.
267. Goldstein, JL, Brown, MS, Anderson, RG, Russell, DW, and Schneider, WJ (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual review of cell biology* **1**: 1-39.
268. Neel, NF, Schutyser, E, Sai, J, Fan, GH, and Richmond, A (2005). Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine & growth factor reviews* **16**: 637-658.
269. Zohlhofer, D, Graeve, L, Rose-John, S, Schooltink, H, Dittrich, E, and Heinrich, PC (1992). The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS letters* **306**: 219-222.
270. Doherty, GJ, and McMahon, HT (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* **78**: 857-902.
271. Grant, BD, and Donaldson, JG (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 597-608.
272. Prisner, L (2011). Untersuchung der Internalisierung des Interleukin-6-Rezeptor-spezifischen RNA-Aptamers AIR-3A. In *Chemistry, Institute for biochemistry and molecular biology*, Hamburg.
273. Macia, E, Ehrlich, M, Massol, R, Boucrot, E, Brunner, C, and Kirchhausen, T (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell* **10**: 839-850.
274. Casella, JF, Flanagan, MD, and Lin, S (1981). Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* **293**: 302-305.

## LITERATUR

275. Koivusalo, M, *et al.* (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of cell biology* **188**: 547-563.
276. Strebhardt, K, and Ullrich, A (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **6**: 321-330.
277. Raab, M, *et al.* (2011). Toxicity modelling of Plk1-targeted therapies in genetically engineered mice and cultured primary mammalian cells. *Nature communications* **2**: 395.
278. InvoGen siRNA Wizard v3.1. <http://www.siRNAwizard.com/siRNA.php>.
279. Stirpe, F, and Battelli, MG (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **63**: 1850-1866.
280. Magbanua, E (2011). Charakterisierung von Interleukin-6-Rezeptor-spezifischen Aptameren. In *Chemistry, Institute for biochemistry and molecular biology*, p. 188. University of Hamburg, Hamburg.
281. Vermathen, M, Marzorati, M, Vermathen, P, and Bigler, P (2010). pH-dependent distribution of chlorin e6 derivatives across phospholipid bilayers probed by NMR spectroscopy. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **26**: 11085-11094.
282. Hsu, CL, *et al.* (2012). Equilibrative nucleoside transporter 3 deficiency perturbs lysosome function and macrophage homeostasis. *Science* **335**: 89-92.
283. Mojzisova, H, Bonneau, S, Maillard, P, Berg, K, and Brault, D (2009). Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **8**: 778-787.
284. Han, SI, Kim, YS, and Kim, TH (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB reports* **41**: 1-10.
285. Gollnick, SO, Vaughan, L, and Henderson, BW (2002). Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer research* **62**: 1604-1608.
286. Kobayashi, W, *et al.* (2006). Photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 can cause necrosis of squamous cell carcinoma of tongue: experimental study on an animal model of nude mouse. *Oral oncology* **42**: 46-50.
287. Zong, WX, and Thompson, CB (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & development* **20**: 1-15.
288. Knobloch, B, Linert, W, and Sigel, H (2005). Metal ion-binding properties of (N3)-deprotonated uridine, thymidine, and related pyrimidine nucleosides in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7459-7464.
289. Berg., K, and Szameit., K (2014). unveröffentlichte Arbeiten zu hIL-6R-bindenden Aptameren.
290. Zuker, M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**: 3406-3415.

## LITERATUR

291. Cadman, E, Heimer, R, and Davis, L (1979). Enhanced 5-fluorouracil nucleotide formation after methotrexate administration: explanation for drug synergism. *Science* **205**: 1135-1137.
292. Pizzorno, G, Sun, Z, and Handschumacher, RE (1995). Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochemical pharmacology* **49**: 553-557.
293. Inaba, M, Tanaka, T, and Sawada, H (1998). Increased sensitivity to long-term 5-fluorouracil exposure of human colon cancer HT-29 cells resistant to short-term exposure. *Japanese journal of cancer research : Gann* **89**: 323-327.
294. Ban., F, Lundqvist., MJ, Boud., RJ, and Eriksson., LA (2002). Theoretical Studies of the Cross-Linking Mechanisms between Cytosine and Tyrosine. *Journal of the American Chemical Society* **124**: 2753-2761.
295. Liu, H, Matsugami, A, Katahira, M, and Uesugi, S (2002). A dimeric RNA quadruplex architecture comprised of two G:G(:A):G:G(:A) hexads, G:G:G:G tetrads and UUUU loops. *Journal of molecular biology* **322**: 955-970.
296. Mukundan, VT, and Phan, AT (2013). Bulges in G-quadruplexes: broadening the definition of G-quadruplex-forming sequences. *Journal of the American Chemical Society* **135**: 5017-5028.
297. Stengel, G, Urban, M, Purse, BW, and Kuchta, RD (2010). Incorporation of the fluorescent ribonucleotide analogue tCTP by T7 RNA polymerase. *Analytical chemistry* **82**: 1082-1089.
298. Giovannoni, G, *et al.* (2010). A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* **362**: 416-426.
299. Murakami, E, *et al.* (2010). Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. *The Journal of biological chemistry* **285**: 34337-34347.
300. Magbanua, E, *et al.* (2013). d(GGGT) 4 and r(GGGU) 4 are both HIV-1 inhibitors and interleukin-6 receptor aptamers. *RNA biology* **10**: 216-227.
301. Gopinath, SC (2009). Mapping of RNA-protein interactions. *Analytica chimica acta* **636**: 117-128.
302. Fourmy, D, and Yoshizawa, S (2012). Protein-RNA footprinting: an evolving tool. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **3**: 557-566.
303. Campbell, N, Collie, GW, and Neidle, S (2012). Crystallography of DNA and RNA G-quadruplex nucleic acids and their ligand complexes. *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L Beaucage [et al]* **Chapter 17**: Unit17 16.
304. Adrian, M, Heddi, B, and Phan, AT (2012). NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods* **57**: 11-24.

## 9 DANKSAGUNG

Besonders danken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn für die Vergabe dieses Themas, sein Vertrauen und die mir gewährten Freiheiten in wissenschaftlichen Entscheidungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Bredehorst bedanke ich mich für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Mein Dank gilt insbesondere auch unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John, Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger und Frau Dr. Inken Lorenzen der Universität Kiel für die gute Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der Proteine und Zellen.

Ebenso danke ich Herrn M.Sc. Marcel Kwiatkowski und Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die konstruktive Kooperation und massenspektrometrische Analysen.

Herrn Prof. Dr. Martin Zacharias danke ich für die hilfreichen Diskussionen und die Anfertigung bioinformatischer Studien.

Ein großer Dank gebührt Frau Dr. Cindy Meyer für die Einführung in das Thema, ihre Betreuung in der ersten Hälfte meiner Arbeit und ihre kritische Diskussionsbereitschaft. Neben ihr danke ich ebenso Frau Dr. Katja Eydeler-Haeder und Frau Dr. Eileen Magbanua, ohne deren wissenschaftliche Arbeit an diesem Thema die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass er stets ein offenes Ohr und einen fachlichen Rat hatte. Dies gilt ebenso für Herrn Dr. Nicolas Piganeau und Frau Prof. Dr. Andrea Rentmeister, die mir mit guten Ratschlägen geholfen haben. Auch bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Maria Trusch für ihren wissenschaftlichen Rat.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Hahn, sowie den anderen Biochemie-Arbeitsgruppen, danke ich für ihre Unterstützung und die angenehme Zeit. Meinen studentischen Praktikanten (Erik, Lisa, Katharina, Aude, Roberto, Daniela und Martina) und TA-Schülern (Magda, Patrick, Eva, Alina, Alex, Kim, Christin und Tobias) danke ich für ihre experimentelle Hilfe.

Meiner Familie und meinen Freunden, sowie meiner Partnerin Kristina gebührt der größte Dank für all ihre Unterstützung in den letzten Jahren.

## 10 ANHANG

## 10.1 GHS-Verordnung

Piktogramm	Bezeichnung	Signalwort	Gefahrenklasse
	<b>GHS01</b> Explodierende Bombe	Gefahr	Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	<b>GHS02</b> Flamme	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	<b>GHS03</b> Flamme über einem Kreis	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	<b>GHS04</b> Gasflasche	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	<b>GHS05</b> Ätzwirkung	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	<b>GHS06</b> Totenkopf mit gekreuzten Knochen	Gefahr	Akute Toxizität
	<b>GHS07</b> Ausrufezeichen	Achtung	
	<b>GHS08</b> Gesundheitsgefahr	Gefahr	Diverse Gesundheitsgefahren
	<b>GHS09</b> Umwelt	Gefahr/ Achtung	Gewässergefährdend

## 10.2 Sicherheitshinweise für Gefahrenstoffe

### H-Sätze (*Hazard Statements*)

---

H225:	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226:	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H272:	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290:	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301:	Giftig bei Verschlucken.
H302:	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H311:	Giftig bei Hautkontakt.
H312:	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314:	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315:	Verursacht Hautreizungen.
H317:	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H319:	Verursacht schwere Augenreizung.
H331:	Giftig bei Einatmen.
H332:	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334:	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335:	Kann die Atemwege reizen.
H336:	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340:	Kann genetische Defekte verursachen
H341:	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
H350:	Kann Krebs erzeugen
H351:	Kann vermutlich Krebs erzeugen
H360D:	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
H361f:	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen
H370:	Schädigt die Organe
H372:	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition
H373:	Kann die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition schädigen

### **P-Sätze (*Precautionary Statements*)**

---

- P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P210: Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- P261: Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P301: Bei Verschlucken:
- P302: Bei Berührung mit der Haut:
- P304: Bei Einatmen:
- P305: Bei Kontakt mit den Augen:
- P308: Bei Exposition oder falls betroffen:
- P311: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P330: Mund ausspülen.
- P331: Kein Erbrechen herbeiführen.
- P338: Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340: Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342: Bei Symptomen der Atemwege:
- P351: Einige min lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352: Mit viel Wasser und Seife waschen.

## 10.3 Gefahrenstoffinformationen

Gefahrstoff	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercapto-ethanol		H301 - H310 - H330 - H315 - H318 - H410	P280 - P273 - P302+P352 - P304+P340 - P305+P351+P338 - P310
5-Fluoruracil / 5-Fluor-2'-desoxyuridin		H301 - H412	P273 - P301+P310
6-Amino-hexansäure		H315 - H319 - H335	P261 - P280 - P302+P352 - P305+P351+P338 - P304+P340
Aceton		H225 - H319 - H336	P210 - P233 - P305+P351+P338
Acrylamid		H301 - H312 - H315 - H317 - H319 - H332 - H340 - H350 - H361f - H372	P280 - P302+P352 - P305+P351 +P338
Ammoniumper-oxodisulfat		H272 - H302 - H315 - H317 - H319 - H334 - H335	P280 - P305+P351+P338 - P302+P352 - P304+P341 - P342+P311
BCIP		H315 - H319 - H335	P261 - P280 - P301+P312 - P304+P340
Bisacrylamid		H302	
Chlorin e6		H302 – H315+H319+H332	P280 - P305+P351
DEPC		H302 – H315 - H319 - H335	P261 - P305+P351+P338
Dithiothreitol		H302 - H315 - H319 - H335	P261 - P280 - P301+P312 - P304+P340
EDC		H314	P280 - P305+P351+P338 - P310
Essigsäure		H226 - H314	P280 - P301+P330+P331 - P305+P351+P338
Ethanol		H225	P210 - P233
Ethidiumbromid		H332 - H341	P281 - P308+P313

ANHANG

Gefahrstoff	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Formaldehyd		H301 - H311 - H314 - H317 - H331 - H351 - H370 - H335	P281 - P310 - P308 - P303+P361+P353 - P304+P340 - P305+P351+P338
Glutardialdehyd		H331 - H301 - H314 - H334 - H317 - H400	P280 - P305+P351+P338 - P270 - P260 - P273 - P308+P313
Imidazol		H302 - H314 - H361d	P260 - P281 - P303+P361+P353 - P301+P330+P331 - P305+P351+P338 -
Isopropanol		H225 - H319 - H336	P210 - P233 - P305+P351+P338
Leucovorin		H315 - H317 - H319 - H334 - H335	P261 - P280 - P305+P351+P338 - P342+P311
Lithiumperchlorat		H272 - H315 - H319 - H335	P220 - P261 - P305+P351+P338
MES		H315 - H319 - H335	P261 - P305+P351+P338
Methanol		H225 - H301+H311+ H331 - H370	P210 - P280 - P233 - P302+P352 - P309 - P310
Methotrexat		H301 - H315 - H319 - H360	P201 - P301+P310 - P305+P351+P338 - P308+P313
Natriumcarbonat		H319	P280 - P305+P351+P338
Natriumdodecylsulfat		H228 - H302+H332 - H315 - H318 - H335 - H412	P210 - P280 - P302+P352 - P304+P340 - P305+P351+P338 - P314
Natriumhydroxid		H290 - H314	P280 - P303+P361+P353 - P301+P330+P331 - P305+P351+P338 - P310 - P406
Natriumperiodat		H272 - H315 - H319 - H335	P220 - P261 - P301+P310 - P305+P351+P338
NBT		H302 - H319	P280 - P301+P312 - P305+P351+P338
Penicillin G		H317	P280

ANHANG

Gefahrstoff	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
Propidiumiodid		H315 - H319 - H335	P261 - P305+P351+P338
Salzsäure (konz.)		H290 - H314 - H335	P280 - P301+P330+P331 - P305+P351+P338
Silbernitrat		H315 - H319 - H412	P280 - P273 - P302+P352 - P305+P351+P338 - P337+P313
Streptomycin		H302	
Tetramethyl-ethylendiamin		H225 - H302 - H314 - H332	P210 - P233 - P280 - P301+P330+P331 - P305+P351+P338
Tris		H315 - H319 - H335	P261 - P280 - P302+P352 - P305+P351+P338 - P304+P340
Trypanblau		H350	P201 - P308+P313
Xylencyanol		H315 - H319 - H335	

## 10.4 Liste der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. I &amp; II

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	30-40%, wässrige Lösungen zur Polymerisation. Verwendete Menge: 300 mL	K1B, M1B, R <sub>F</sub> 2
56-65-5	Adenosintriphosphat	radioaktives Isotop ( <sup>32</sup> P) zur radioaktiven Markierung von Nucleinsäuren. Verwendete Menge: 400 µL	
72-57-1	Cycloheximid	wässrige Lösung in der Zellkultur (1mg/mL). Verwendete Menge: 30 µL	M2, R <sub>E</sub> 1B
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/mL wässrige Lösung zur Färbung von Nucleinsäuren in Polyacrylamidgelen. Verwendete Menge: 300 µL	M2
50-00-0	Formaldehyd	37% ige Lösung für die Fixierung von Zellen und für die Silberfärbung von Proteingelen. Verwendete Menge: 1 mL	K2
288-32-4	Imidazol	4 mM Lösung zur Fragmentierung von RNA. Verwendete Menge: 100µL	R <sub>E</sub> 1B
68-12-2	N,N Dimethylformamid	Lösungsmittel. Verwendete Menge:1 mL	R <sub>E</sub> 1B
108-95-2	Phenol	Zur Extraktion von Nucleinsäuren. Verwendete Menge: 1 mL	M2
25535-16-4	Propidiumiodid	Wässrige Lösung zur Färbung von zellulärer DNA (10 µg/mL). Verwendete Menge: 30 mL	M1B
67-66-3	Trichlormethan	Zur Reinigung von Nucleinsäuren in der Phenol-Extraktion. Verwendete Menge: 1 mL	K1B 2, M2, R <sub>E</sub> 2

### 10.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Materialien oder Leistungen, die von anderen Personen hergestellt bzw. erbracht wurden, wurden als solche gekennzeichnet. Ich versichere außerdem, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch nie einer Prüfungsstelle zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde. Es wurden keine früheren Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Hamburg, den 03.09.2014



---

Sven Kruspe

## 10.6 Lebenslauf

### Curriculum Vitae

---

#### Dipl. Chem. Sven Kruspe

geboren am 6. April 1980, Hamburg, Deutschland.

#### Ausbildung

1999 Abitur in Hamburg (Gesamtnote: 1,4)

1998-2000 Ausbildung zum Chemisch-Technischen Assistent

2001-2009 Studium der Chemie (Universität Hamburg), Abschluss: Diplom (Gesamtnote: 1,2)

2010 Diplomarbeit (AK Prof. Hahn, Universität Hamburg),  
Spezialisierung: Fluoreszenz Korrelation Spektroskopie (FCS)

seit 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (AK Prof. Hahn, Universität Hamburg); Doktorarbeit,  
Thema: *Aptamervermittelter Wirkstofftransport*

#### Wissenschaftliche Erfahrungen

##### *im Studium:*

Organische und Anorganische Synthese (inkl. Schlenk Technik) und Analytik.

2006 Auslandspraktikum bei Prof. Ian Nicholls (Kalmar, SWE) in  
Bioorganischer Chemie

##### *während der Doktorarbeit:*

Nukleinsäure-Analytik, Analyse von RNA-Protein und DNA-Protein Interaktionen, *Active Drug Targeting* (Synthese von Wirkstoffkonjugaten und Analyse deren zellspezifischer Wirkung).

*Instrumentelle Methoden:*

Kernspinresonanzspektroskopie, IR-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie, Massenspektrometrie, Gaschromatographie, HPLC, konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenz-Korrelation Spektroskopie, Durchflusszytometrie, CD-Spektroskopie.

**Lehrerfahrung**

2004-2008 *Universitäre Lehrtätigkeit* (Seminare und praktische Kurse in allgemeiner Chemie für Medizin- und Zahnmedizinstudierende)  
2008-2010 *Schulische Lehrtätigkeit* (Chemie und Biologie, Mittel- und Oberstufe, Gesamtschule Benzenbergweg, Hamburg)  
2010-2013 *Universitäre Lehrtätigkeit: RNA Biochemie*  
seit 2010 *Praktische Betreuung von Studenten und Auszubildenden* (chemische, biochemische und zellbiologische Laborarbeit)

**Veröffentlichungen**

- [1] S. Kruspe, C. Meyer, U. Hahn, Chlorin e6 conjugated interleukin-6 receptor aptamers selectively kill target cells upon irradiation, *Mol. Ther. Nucl. Acids* **2014**, 3, e143.  
doi:10.1038/mtna.2013.70
- [2] S. Kruspe, F. Mittelberger, K. Szameit, U. Hahn, Aptamers as drug delivery vehicles, *ChemMedChem* **2014**, 9, 1998-2011.  
doi: 10.1002/cmdc.201402163.
- [3] S. Kruspe, U. Hahn, An aptamer intrinsically comprising the cytostaticum 5-Fluoro-2'-deoxyuridine for targeted chemotherapy, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, 53, 10541-10544.;  
Ein intrinsisch 5-Fluor-2'-desoxyuridin beinhaltendes Aptamer für die gezielte Chemotherapie, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 10711-10715.  
doi: 10.1002/anie.201405778 (englisch)  
doi: 10.1002/ange.201405778 (deutsch)

**Konferenzbeiträge**

- 2011 *8. Hamburger Studententagung*, Posterbeitrag  
2013 *International Symposium of the GBM – Molecular Life Sciences*, Posterbeitrag  
2014 *North German Biophysics Meeting*, Vortrag und Posterbeitrag.