

# **Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamere**

**DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
**Cindy Meyer**  
aus Rochlitz

Die vorgelegte Arbeit wurde von Mai 2006 bis Oktober 2009 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

Gutachter:

Herr Professor Dr. Ulrich Hahn

Herr Professor Dr. Reinhard Bredehorst

Tag der Disputation: 18.12.2009

**Für meine Familie**

## Inhaltsverzeichnis

|  |      |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis.....  | I    |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                      | V    |
| Abstract .....   | VIII |
| Kurzfassung.....   | X    |
| 1 Einleitung .....   | 1    |
| 1.1 Das Zytokin Interleukin-6 .....                              | 1    |
| 1.2 Der Interleukin-6-Rezeptor .....                             | 2    |
| 1.3 IL-6 und der sIL-6R im Kontext von Erkrankungen.....         | 7    |
| 1.4 Aptamere .....   | 10   |
| 1.5 <i>In vitro</i> Selektion von Aptameren .....                | 11   |
| 1.6 Aptamere versus Antikörper .....                             | 13   |
| 1.7 Aptamere als Therapeutika.....                               | 14   |
| 2 Zielsetzung .....  | 16   |
| 3 Material .....   | 17   |
| 3.1 Chemikalien .....  | 17   |
| 3.2 Puffer, Lösungen und Medien .....                            | 17   |
| 3.3 Enzyme.....  | 19   |
| 3.4 Protein- und DNA-Standards .....                             | 20   |
| 3.5 Kommerziell erhältliche Kits .....                           | 20   |
| 3.6 Nukleotide und Radionukleotide.....                          | 20   |
| 3.7 Fluorophore .....  | 20   |
| 3.8 Allgemeine Materialien zur Aptamer-Selektion .....           | 20   |
| 3.9 Synthetische Oligonukleotide .....                           | 21   |
| 3.10 Antikörper und Proteine .....                               | 22   |
| 3.11 Bakterienstamm.....   | 23   |
| 3.12 Zelllinien .....  | 24   |
| 4 Methoden.....  | 25   |
| 4.1 Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren .....   | 25   |
| 4.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....         | 25   |
| 4.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ..... | 25   |
| 4.1.3 Denaturierende PAGE zur RNA-Sequenzierung .....            | 26   |
| 4.1.4 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid .....    | 26   |

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| 4.1.5 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Autoradiographie.....                       | 26 |
| 4.1.6 Detektion fluoreszenzmarkierter RNA.....                                       | 27 |
| 4.1.7 Nachweis von Nukleinsäuren mittels UV-Shadowing.....                           | 27 |
| 4.1.8 Diffusionselution von Nukleinsäuren aus PAA-Gelen .....                        | 27 |
| 4.1.9 Ethanolpräzipitation .....   | 28 |
| 4.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....                              | 28 |
| 4.2 Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren .....                             | 28 |
| 4.2.1 <i>Fill-In</i> -Reaktion zur Erzeugung einer dsDNA-Bibliothek.....             | 28 |
| 4.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....                  | 29 |
| 4.2.3 Kolonie-PCR .....  | 31 |
| 4.2.4 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....                 | 31 |
| 4.2.5 Reinigung von PCR-Produkten mittels <i>PCR Purification Kit</i> .....          | 32 |
| 4.2.6 <i>In vitro</i> T7-Transkription zur Herstellung der RNA-Startbibliothek.....  | 32 |
| 4.2.7 <i>In vitro</i> T7-Transkription als Teil einer Selektionsrunde.....           | 33 |
| 4.2.8 T7-Transkription zur radioaktiven Markierung von RNA .....                     | 33 |
| 4.2.9 GTPS-T7-Transkription zur Fluoreszenzmarkierung von RNA.....                   | 33 |
| 4.2.10 Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA.....                                     | 34 |
| 4.2.11 Radioaktive 3'-Endmarkierung von RNA.....                                     | 35 |
| 4.2.12 Spaltung von RNA mit Ribonuklease T1 (RNase T1).....                          | 36 |
| 4.2.13 Partielle alkalische Hydrolyse von Ribonukleinsäuren.....                     | 37 |
| 4.3 Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse .....                                     | 37 |
| 4.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....           | 37 |
| 4.3.2 Anfärben von Proteinen mit <i>Coomassie Brilliant Blue</i> .....               | 38 |
| 4.3.3 Biotinylierung von Proteinen .....   | 38 |
| 4.3.4 Dialyse.....   | 38 |
| 4.3.5 Dot Blot .....   | 39 |
| 4.3.6 Kopplung biotinylierter Proteine an Dynabeads® .....                           | 39 |
| 4.4 <i>In Vitro</i> Selektion von RNA-Aptameren mittels magnetischer Beads.....      | 39 |
| 4.5 Klonierungsmethoden .....  | 40 |
| 4.5.1 <i>TOPO TA Cloning</i> ® .....   | 40 |
| 4.5.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation.....     | 40 |
| 4.5.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen mittels Elektroporation ..... | 41 |
| 4.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen.....                      | 41 |
| 4.5.5 DNA-Sequenzierung .....  | 41 |

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| 4.6 Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktionen.....                 | 42 |
| 4.6.1 Analytische Filterbindungsstudien .....  | 42 |
| 4.6.2 Analyse von Aptamer-Protein-Interaktionen mittels nativer PAGE.....                | 43 |
| 4.6.3 „ <i>Damage Selection</i> “: Minimalmotivsuche sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere .. | 43 |
| 4.6.4 Sekundärstrukturanalyse selektierter RNA-Aptamere .....                            | 44 |
| 4.6.5 Verkürzung von RNA-Aptameren anhand vorausgesagter Sekundärstrukturen ....         | 44 |
| 4.7 Zellbiologische Arbeiten .....   | 44 |
| 4.7.1 Stammhaltung und Kultivierung eukaryotischer Zellen .....                          | 44 |
| 4.8 Durchflusszytometrie .....   | 45 |
| 4.8.1 Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen .....                             | 46 |
| 4.8.2 Analyse der Aptamerbindung an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen .....                      | 47 |
| 5 Ergebnisse .....   | 48 |
| 5.1 Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für den sIL-6R .....                       | 48 |
| 5.1.1 Herstellung der RNA-Startbibliothek R1 .....                                       | 48 |
| 5.1.2 Biotinylierung des sIL-6R und Kopplung an Dynabeads® .....                         | 50 |
| 5.1.3 Selektion sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere .....                                   | 52 |
| 5.2 Erste Bindungsstudien der angereicherten RNA-Bibliothek an sIL-6R .....              | 54 |
| 5.3 Klonierung und Sequenzierung der für sIL-6R spezifischen Bibliothek .....            | 56 |
| 5.4 Charakterisierung der sIL-6R spezifischen RNA-Aptamere .....                         | 57 |
| 5.4.1 Sekundärstrukturanalyse .....  | 57 |
| 5.4.2 Filterbindungsstudien sIL-6R spezifischer RNA-Aptamere .....                       | 58 |
| 5.4.3 Abhängigkeit der Aptamerbindung von Magnesiumionen und vom pH-Wert.....            | 61 |
| 5.4.4 Einfluss monovalenter Kationen auf die Aptamerbindung .....                        | 63 |
| 5.4.5 <i>Gel-Shift</i> -Assay zur Analyse der sIL-6R-Aptamer-Interaktion .....           | 65 |
| 5.4.6 Analyse der Aptamerspezifität .....  | 66 |
| 5.5 Wettbewerbsstudien.....  | 69 |
| 5.5.1 Wettbewerbsanalyse zwischen Aptamer 16-3 und Interleukin-6.....                    | 69 |
| 5.5.2 Interaktion des Aptamers 16-3 mit Hyper-IL-6 (H-IL-6) und sgp130Fc.....            | 71 |
| 5.6 Minimalmotivsuche der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere.....                          | 74 |
| 5.6.1 „ <i>Damage Selection</i> “ .....  | 74 |
| 5.6.2 Verkürzung der Aptamere anhand von Sekundärstrukturvorhersagen .....               | 76 |
| 5.7 Mutationanalysen des Aptamers 16-3_B .....   | 79 |
| 5.8 Stabilität der RNA-Aptamere in Zellkulturmedium.....                                 | 82 |
| 5.9 Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen .....                               | 83 |

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |     |
|---|-----|
| 5.10 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an IL-6R-tragende Zellen .....    | 84  |
| 5.11 Konkurrenz zwischen Aptamer 16-3 und dem Anti-hIL-6R-AK .....            | 86  |
| 6 Diskussion .....  | 87  |
| 6.1 Selektion und Charakterisierung IL-6R-spezifischer RNA-Aptamere .....     | 88  |
| 6.2 Konkurrenzstudien zwischen Aptamer und IL-6R-Liganden.....                | 91  |
| 6.3 Verkürzung des sIL-6R bindenden Aptamers 16-3.....                        | 94  |
| 6.4 Hypothese eines G-Quadruplexes als stabilisierendes Strukturelement ..... | 95  |
| 6.5 Bindung der Aptamere an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen.....                    | 97  |
| 7 Ausblick .....  | 100 |
| Literaturverzeichnis.....   | 102 |
| Danksagung.....   | 109 |
| Selbstständigkeitserklärung.....  | 111 |
| Anhang .....  | 112 |
| Gefahrstoffsymbole .....  | 112 |
| Gefahrstoffinformationen.....   | 112 |
| Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I und II.....                     | 113 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| A              | Adenin   |
| AMD            | Altersbedingte Makuladegeneration  |
| AK             | Antikörper   |
| AP             | Alkalische Phosphatase   |
| APS            | Ammoniumperoxydisulfat   |
| AS             | Aminosäure   |
| ATP            | Adenosintriphosphat  |
| BAF/3          | <i>bone marrow-derived pro-B-cell line</i>                                 |
| BCIP           | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat   |
| bp             | Basenpaar  |
| BSA            | Rinderserumalbumin   |
| CD             | Zirkulardichroismus-Spektroskopie  |
| cDNA           | <i>copyDNA</i>   |
| CEA            | Karzinembryonales Antigen ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )              |
| CEACAM1        | CEA-Zelladhäsionsmolekül 1 ( <i>CEA-related cell adhesion molecule 1</i> ) |
| Ci             | Curie  |
| CMCT           | 1-Cyclohexyl-3(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat         |
| cpm            | Zählimpulse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )                        |
| C              | Cytosin  |
| Da             | Dalton   |
| DEAE           | Diethylaminoethyl  |
| DEPC           | Diethylpyrocarbonat  |
| DMS            | Dimethylsulfoxid   |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )                   |
| DNase          | Desoxyribonuklease   |
| dNTP           | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat  |
| dsRNA          | Doppelsträngige RNA ( <i>double stranded RNA</i> )                         |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )    |
| FACS           | <i>fluorescence activated cell sorting</i>                                 |
| FITC           | Fluoresceinisothiocyanat   |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                   |   |
|-------------------|---|
| FKS               | Fötale Kälberserum  |
| FSC               | Vorwärtsstreulicht ( <i>forward-scatter</i> )                 |
| G                 | Guanin  |
| g                 | Erdbeschleunigung   |
| gp130             | Glykoprotein 130  |
| GTPS              | Guanin-5'-O-(3-thiotriphosphat)                               |
| HAc               | Essigsäure  |
| H-IL-6            | Hyper-IL-6  |
| hIL-6R            | humaner Interleukin-6-Rezeptor                                |
| IgG               | Immunglobulin G   |
| IL-6              | Interleukin 6   |
| IL-6R             | Interleukin-6-Rezeptor  |
| JAK               | Janus-Kinase  |
| LB                | <i>lysogeny broth</i>   |
| M                 | Molar   |
| M                 | Molare Masse  |
| mAk               | Monoklonaler Antikörper                                       |
| MAP               | Mitogen-aktiviertes Protein                                   |
| MAPK              | MAP-Kinase  |
| MEK               | MAP-Kinase-Kinase   |
| mRNA              | <i>messengerRNA</i>   |
| MWCO              | <i>molecular weight cut off</i>                               |
| NBT               | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid                                  |
| NHS               | N-Hydroxy-Succinimid  |
| NTPs              | Nukleosid-5'-triphosphate                                     |
| OD <sub>600</sub> | Optische Dichte, gemessen bei 600 nm                          |
| PAA               | Polyacrylamid   |
| PAGE              | Polyacrylamidgelelektrophorese                                |
| PCR               | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> ) |
| PEG               | Polyethylenglykol   |
| PNK               | Polynukleotidkinase   |
| p53               | Tumorsuppressorprotein p53                                    |
| RNA               | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                  |
| RNase             | Ribonuklease  |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|            |   |
|------------|---|
| RT         | Raumtemperatur  |
| RT         | Reverse Transkription   |
| rpm        | Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )   |
| ssDNA      | Einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )  |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat  |
| SELEX      | Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung<br>( <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> ) |
| sgp130Fc   | lösliches gp130 in Fusion mit Fc-Region eines humanen IgG1  |
| sIL-6R     | löslicher Interleukin-6-Rezeptor  |
| SOC        | <i>salt-optimized + carbon</i>  |
| SSC        | Seitwärtsstreulicht ( <i>side-scatter</i> )   |
| STAT       | <i>signal transducer and activator of transcription</i>   |
| T          | Thymin  |
| TACE       | <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> converting enzyme</i>  |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus Aquaticus</i>  |
| TBE        | Tris-Borat-EDTA   |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| TF         | Transkriptionsfaktor  |
| TNF        | Tumor-Nekrose-Faktor  |
| Tris       | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| U          | Uracil  |
| U          | Unit  |
| UV         | Ultraviolett  |
| VEGF       | <i>vascular epithelial growth factor</i>  |
| v/v        | Volumenanteil ( <i>volume-volume percentage</i> )   |
| w/v        | Massenanteil ( <i>weight-volume percentage</i> )  |

## Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional pro- and anti-inflammatory cytokine which regulates the growth and differentiation of various tissues. It plays a pivotal role in immune responses and acute phase reactions. In various diseases, for example rheumatoid arthritis and colon cancer, elevated IL-6 levels were observed, promoting the progression and pathology of these diseases. The inhibition of the IL-6 signal transduction pathway via the IL-6 receptor system therefore seems to be a potentially useful therapeutic strategy. Several approaches can be proposed: the blockade of IL-6 binding to the IL-6 receptor (IL-6R) or the blockade of IL-6/IL-6R complex binding to the signal transducing subunit gp130.

One possible strategy could be the application of aptamers, small single-stranded nucleic acids with a defined three-dimensional structure that are able to bind target molecules with high affinity and specificity.

This thesis reports on the development of RNA aptamers with high affinity for the IL-6R. The use of an appropriate *in vitro* selection procedure, **SELEX** (Systematic Evolution of Ligands by **EX**ponential enrichment), enabled the isolation of six IL-6R specific ribonucleic acids (106 nt) displaying a characteristic G-rich consensus motif. One aptamer, 16-3, was further investigated using different methods like filter binding or gel shift assays. The affinity of aptamer 16-3 was in the range of other aptamer-receptor interactions with a dissociation constant in the low nanomolar range ( $K_d \sim 20$  nM).

The specificity of the aptamer to its target was demonstrated using a variety of other proteins. In further experiments the aptamer could be shortened to 47 nt without loss of affinity, while a 19 nt long variant limited to the G-rich motif retained slight affinity. Further biochemical analyses, including filter binding assays using variants with base exchanges and the dependency on monovalent cations led to the assumption that the aptamer adopted a guanine quadruplex structure.

Aptamer 16-3 did not compete with the natural IL-6R ligands IL-6 and gp130, since 16-3 was still able to bind the soluble IL-6R (sIL-6R) in complex with these molecules. Interactions of the aptamer with Hyper-IL-6, a high biologically active IL-6/sIL-6R-fusion protein, alone or in complex with gp130 confirmed these observations.

Flow cytometry experiments demonstrated that the aptamers were able to recognize the native IL-6 receptor presented on the cell surface of murine Baf/3 cells that were stable transfected with human gp130 and IL-6R cDNAs. The ability of the aptamers to inhibit IL-6R activities *in vivo* still needs to be determined.

## ABSTRACT

The data of this thesis demonstrate that Aptamer 16-3 binds to IL-6R in solution as well as on the cell surface thus allowing to access IL-6R presenting cells. These aptamers may help to optimize the design of useful tools blocking IL-6R functions and may pave the way for the development of novel therapeutic strategies against IL-6R related diseases. Furthermore it will have to be tested whether this aptamer may serve as highly specific carrier for further nucleic acids, peptides and/or toxins linked to the aptamer when possibly internalised in complex with the receptor.

### **Kurzfassung**

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales pro- und anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin, welches das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Gewebe beeinflusst. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunreaktionen und der Akute-Phase-Reaktion. An Zielzellen stimuliert IL-6 seinen Rezeptorkomplex bestehend aus zwei Rezeptoruntereinheiten, dem IL-6-Rezeptor (IL-6R) und dem Glykoprotein 130 (gp130).

Im Mausmodell konnte beobachtet werden, dass IL-6 das Fortschreiten und die Pathologie einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen fördert, wie beispielsweise bei Morbus Crohn, Rheumatoide Arthritis und entzündlichem Darmkrebs. Eine potentielle therapeutische Strategie stellt demnach die Hemmung der IL-6-vermittelten Signalgebung dar, beispielsweise durch eine Blockade der Interaktion zwischen IL-6 und IL-6R oder durch die Blockade der Bindung des IL-6/IL-6R-Komplexes an die Signalweiterleitende Rezeptor-Untereinheit gp130.

Eine vielversprechende Möglichkeit hierfür böte der Einsatz von Aptameren. Aptamere sind kleine einzelsträngige Nukleinsäuren mit definierter dreidimensionaler Struktur, die ihre Zielmoleküle hoch affin und spezifisch binden können.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von RNA-Aptameren mit Spezifität für den löslichen IL-6R (sIL-6R), d. h. den IL-6R ohne zytoplasmatische und Transmembran-Domäne. Die Anwendung des *in vitro* Selektionsverfahrens **SELEX** (Systematic *E*volution of *L*igands by *EX*ponential enrichment) ermöglichte die Isolation von sechs IL-6R-spezifischen Ribonukleinsäuren (106 nt), welche sich durch ein gemeinsames, G-reiches Konsensusmotiv auszeichneten. Eine dieser Spezies, das Aptamer 16-3, wurde weiter mit Hilfe von Filterbindungsstudien analysiert. Die Dissoziationskonstante, welche die Affinität zwischen Aptamer und sIL-6R beschreibt, lag im unteren nanomolaren Bereich ( $K_d \sim 20$  nM). In *Gel-Shift*-Assays konnte diese hoch affine Interaktion bestätigt werden. Das Aptamer besitzt eine signifikante Spezifität für das Targetprotein. Mit keinem anderen getesteten Protein konnte eine Interaktion mit dem Aptamer beobachtet werden. Die Verkürzung des Aptamers 16-3 resultierte in einem 47mer (16-3\_B) mit zum Wildtyp-Aptamer vergleichbaren Eigenschaften. Selbst eine auf 19 Nukleotide verkürzte Variante konnte noch immer mit dem Zielprotein wechselwirken. Weitere biochemische Analysen führten zu der Hypothese, dass das Aptamer einen G-Quadruplex ausbildet.

In Kompetitionsstudien konnte gezeigt werden, dass das Aptamer nicht mit den natürlichen IL-6R-Liganden, IL-6 und gp130, kompetierte. Es war zur Erkennung des sIL-6R im

## KURZFASSUNG

Komplex mit diesen Molekülen befähigt. Interaktionen des Aptamers mit Hyper-IL-6, einem IL-6/sIL-6R-Fusionskonstrukt, allein oder im Komplex mit gp130 bestätigten diese Beobachtungen. Die Anwendung der Durchflusszytometrie führte zu der Erkenntnis, dass die Aptamere spezifisch an murine BAF/3-Zellen binden konnten, die den nativen IL-6R auf ihrer Oberfläche präsentieren.

In zukünftigen Studien bleibt nun zu klären, ob die Aptamere lediglich eine markierende Funktion besitzen oder ob diese hoch affinen Ribonukleinsäuren *in vivo* in der Lage sind, die Wirkung des IL-6R zu blockieren. Möglicherweise könnten diese selektierten IL-6R-spezifischen Aptamere der Entwicklung und Optimierung von Wirkstoffen zur Behandlung IL-6R-bedingter Krankheiten dienen. Denkbar wäre auch die Darstellung von Komplexen aus Aptamer und diversen Liganden (z. B. auch Antisense-Nukleinsäuren oder Toxinen), die die IL-6-Bindung blockieren oder im Komplex mit dem Rezeptor internalisiert werden könnten.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Zytokin Interleukin-6

Zytokine sind körpereigene Botenstoffe, die von vielen verschiedenen Körperzellen, wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, B- und T-Zellen, produziert werden. Ihnen werden wichtige regulatorische Funktionen innerhalb vieler biologischer Vorgänge, unter anderen die Steuerung der körpereigenen Immunabwehr, die Regulation von Wachstumsvorgängen, Hämatopoese, Zellproliferation, Tumorwachstum und Entzündungsreaktionen, zugeschrieben [1]. Zytokine werden ihrer Wirkung entsprechend in pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Vertreter unterteilt. Pro-inflammatorische Zytokine sind beispielsweise der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und IL-8. Zu den anti-inflammatorischen Zytokinen zählen die Interleukine IL-4, IL-10 sowie IL-11.

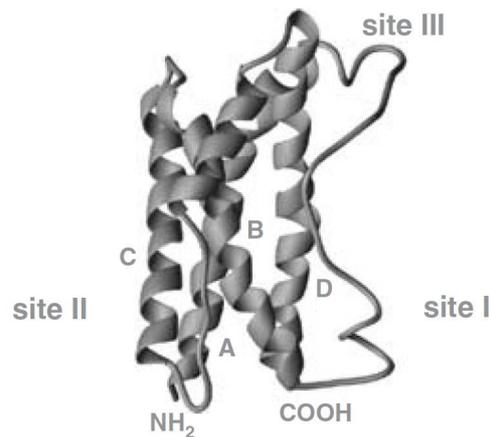
Das Interleukin-6 (IL-6) wurde sowohl als pro-inflammatorisches, als auch als anti-inflammatorisches Zytokin beschrieben [2]. Die Hauptproduzenten dieses multifunktionalen Wachstumsfaktors stellen verschiedene Zelltypen, wie Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten, dar, die *in vivo* direkt durch bakterielle Endotoxine oder virale Nukleinsäuren stimuliert werden können. IL-6 besitzt sehr vielfältige biologische Aktivitäten. Neben einer zentralen Rolle während der Entzündungsreaktion durch Induktion von Akute-Phase-Proteinen stimuliert es B- bzw. T-Zellfunktionen und regt die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen an. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über verschiedene Funktionen des IL-6.

**Tab. 1.1: Auswahl wichtiger Funktionen von Interleukin-6 (IL-6)**

| Zielzellen                  | Funktion/Wirkung   | Quelle |
|-----------------------------|--|--------|
| B-Zellen                    | Wachstum, Stimulation, Differenzierung                                       | [3]    |
| T-Zellen                    | Wachstum, Differenzierung in zytotoxische T-Zellen                           | [4]    |
| Hepatozyten                 | Hepatozyten-stimulierender Faktor (HSF), Induktion von Akut-Phase-Reaktionen | [3]    |
| Makrophagen, Megakaryozyten | Differenzierung  | [5]    |
| Synoviale Fibroblasten      | Induktion der Proliferation  | [6]    |
| Humane Myelomzellen         | Stimulation des Wachstums  | [7]    |
| Neuronen                    | Wachstum und Differenzierung   | [8]    |
| Plasmazytomzellen (Maus)    | Stimulation des Wachstums  | [9]    |

## 1 EINLEITUNG

Die genetische Information für das Interleukin-6 ist auf dem Chromosomenabschnitt 7p21 lokalisiert. IL-6 wird in Form eines 212 Aminosäuren (AS) langen, inaktiven Propeptids synthetisiert, das unter Abspaltung von 38 AS aktiviert wird. Interleukin-6 besteht somit aus 184 Aminosäuren, gehört zu der 4-Helix-Bündel-Familie (Abb. 1.1; [10]) und weist drei potentielle Bindungsstellen zum Rezeptor auf: I, II und III.

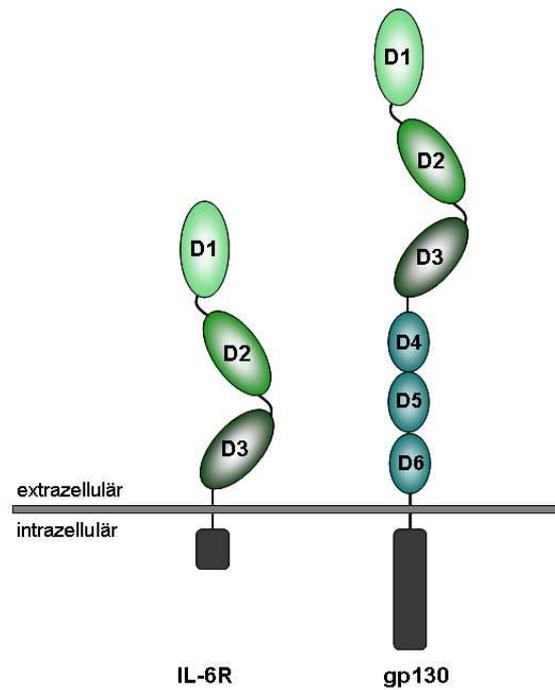


**Abb. 1.1: Humanes Interleukin-6 (IL-6) [10].** IL-6 (hier schematisch dargestellt) besitzt drei potentielle Bindungsstellen (*site I, II und III*) zum Rezeptor. Der N- und C-Terminus sowie die vier  $\alpha$ -Helices (A, B, C und D) sind gekennzeichnet.

### 1.2 Der Interleukin-6-Rezeptor

Die Initiation einer biologischen Signalkaskade in Zielzellen als Folge einer IL-6-bedingten Stimulation erfordert die Anwesenheit zweier Rezeptoruntereinheiten: den IL-6-Rezeptor (IL-6R,  $\alpha$ -Kette) und das Glykoprotein gp130 ( $\beta$ -Kette).

Der IL-6-Rezeptor ist für die IL-6-Bindung verantwortlich. Die cDNA des humanen IL-6R kodiert für ein Vorläuferprotein bestehend aus 468 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa. Dieses Protein setzt sich aus einem Signalpeptid (19 AS), einer extrazellulären Region (339 AS), einer Transmembran-Domäne (28 AS) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (82 AS) zusammen. Der reife IL-6R hat eine Größe von 80 kDa und stellt die glykosylierte Form des 50 kDa-Precursor-Proteins dar [11]. Der extrazelluläre Bereich des Proteins besitzt drei charakteristische Domänen: D1, D2 und D3 (Abb. 1.2). Bei der N-terminalen Domäne D1 handelt es sich um eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, die für die Stabilität des Proteins wichtig ist [12]. D2 und D3 sind als Zytokin-bindende Domänen (CDB) für die Interaktion mit dem Liganden IL-6 verantwortlich.



**Abb. 1.2: Der Interleukin-6-Rezeptor und das Glykoprotein 130 (nach [13]).** Dargestellt sind die Domänen des IL-6R (links) und gp130 (rechts). Extrazelluläre Domänen: D1: N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne, D2 und D3: homologe, Zytokin-bindende Domänen (CBD). Gp130 besitzt zusätzlich drei membrannah Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen (D4 – D6). An diese extrazellulären Domänen schließen sich je eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne (schwarz) an.

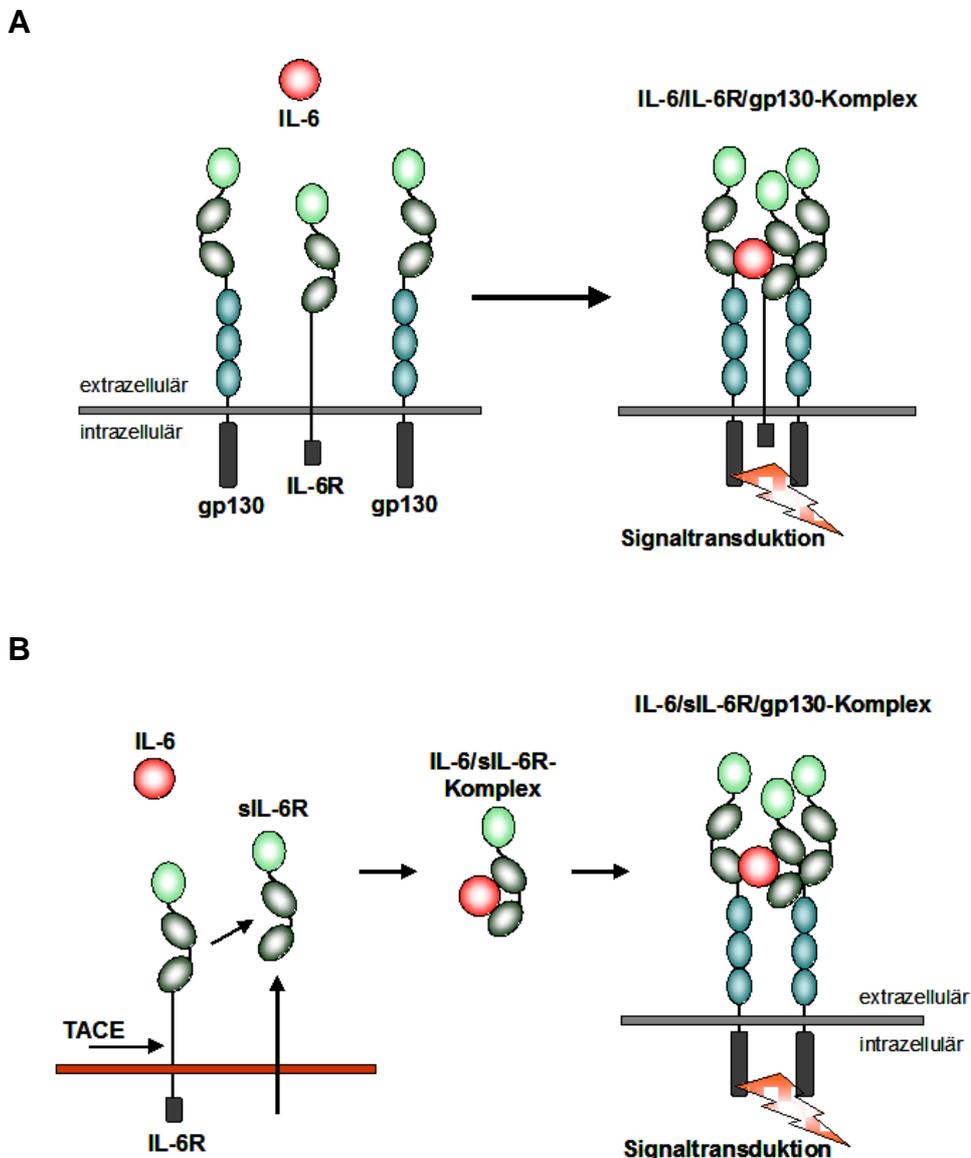
Nach Bindung des IL-6 an die erste Rezeptoruntereinheit (IL-6R) erfolgt die Weiterleitung des Signals in die Zelle über das Glykoprotein gp130 ( $\beta$ -Kette), die zweite Rezeptoruntereinheit (Abb. 1.2). Die drei extrazellulären Domänen D1 – D3 des gp130 vermitteln die Bindung an den IL-6/IL-6R-Komplex. Die folgenden Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen (D4 – D6) befähigen das Protein zur Signaltransduktion ins Zellinnere.

Das Signalweiterleitende Protein gp130 kann neben dem IL-6/IL-6R-Komplex auch mit anderen Ligand/Rezeptor-Komplexen interagieren, z. B. Komplexe für IL-11, Oncostatin-M, Neuropoietin oder IL-21 [10].

Während gp130 von fast allen Körperzellen exprimiert wird, beschränkt sich die Expression des IL-6R auf Hepatozyten, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und einige Lymphozyten [14, 15]. Diese Zellen können durch Bindung des IL-6 an den IL-6R stimuliert werden. Der sich bildende Komplex interagiert mit zwei Molekülen gp130, wodurch eine IL-6-spezifische intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird. Dieser Mechanismus wird als klassisches IL-6-Signaling bezeichnet (Abb. 1.3, A) [16]. Zellen, die keinen membrangebundenen IL-6-Rezeptor besitzen, können nicht auf dem Wege des klassischen IL-6-Signaling stimuliert werden.

## 1 EINLEITUNG

Neben dem klassischen *IL-6-Signaling* existiert ein alternativer Mechanismus, der es Zellen ohne membrangebundenen IL-6-Rezeptor ermöglicht, auf eine IL-6-Stimulation zu reagieren, das sogenannte *IL-6-Trans-Signaling* (Abb. 1.3, B).



**Abb. 1.3: Klassisches IL-6-Signaling und IL-6-Trans-Signaling (verändert nach [17]).** A) Klassisches IL-6-Signaling: IL-6 bindet den membrangebundenen IL-6-Rezeptor. Der IL-6/IL-6R-Komplex interagiert mit einem gp130-Dimer, wodurch die IL-6-vermittelte Signalkaskade ausgelöst wird. B) IL-6-Trans-Signaling: Durch alternatives Spleißen oder die TACE-vermittelte limitierte Proteolyse des membrangebundenen IL-6-Rezeptors wird eine lösliche Form des IL-6R erzeugt. Nach Bindung des sIL-6R an IL-6 kommt es zur Interaktion mit Membran-verankertem gp130. Eine Stimulation von Zellen, welche zwar gp130, jedoch keinen IL-6R tragen, wird ermöglicht.

Die Wirkungsweise beruht auf einer natürlich vorkommenden, löslichen Form des IL-6R (sIL-6R). Diese Form kann durch limitierte Proteolyse des Membran-ständigen IL-6R erzeugt werden. Diese als „Shedding“ bezeichnete Reaktion wird durch die Protease TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) katalysiert [10, 18]. Makrophagen und Neutrophile sind wichtige

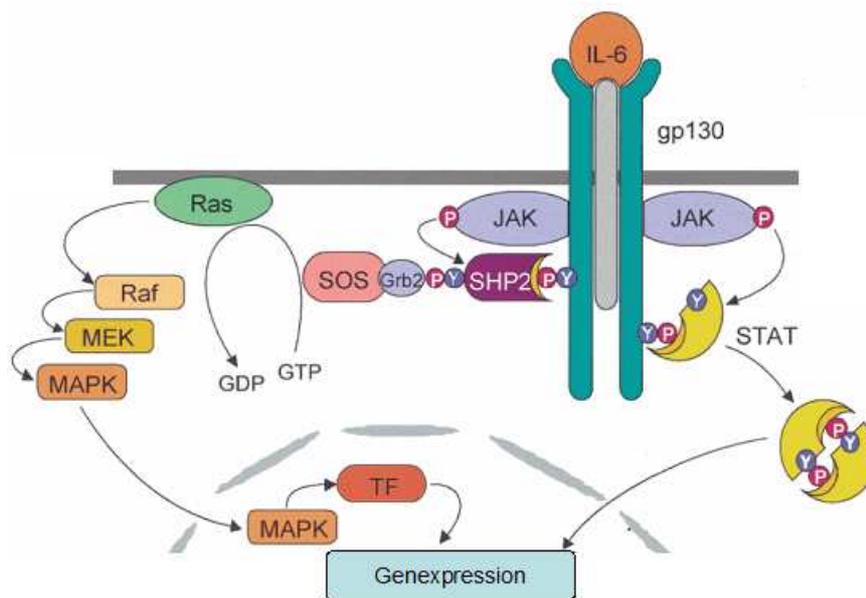
## 1 EINLEITUNG

Produzenten des sIL-6R, beispielsweise als Reaktion auf das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein [19].

Andererseits kann der sIL-6R durch die Translation einer alternativ gespleißten mRNA generiert werden, wobei dieser Prozess bei der Produktion des sIL-6R im Vergleich zur limitierten Proteolyse vermutlich eine eher untergeordnete Rolle spielt [16].

Der in vielen Körperflüssigkeiten vorhandene sIL-6R bindet seinen Liganden IL-6 mit zum Membran-ständigen IL-6R vergleichbarer Affinität, was durch eine Dissoziationskonstante von etwa 1 nM charakterisiert ist [16, 20]. Der Bindung von IL-6 an sIL-6R folgt die Interaktion mit einem Membran-verankerten gp130-Homodimer (Abb. 1.3, rechts), wodurch IL-6R-defiziente Zellen empfänglich für Signale des Zytokins IL-6 werden.

Es schließt sich die Aktivierung gp130-assoziiierter zytoplasmatischer Tyrosinkinassen (JAK1, JAK2 und TYK2) und damit die Phosphorylierung der Faktoren STAT1 und STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) an [2]. Diese phosphorylierten, monomeren Einheiten bilden daraufhin Homo- oder Heterodimere, wandern in den Nukleus ein und regulieren die Transkription verschiedener Zielgene (Abb. 1.4). IL-6 kann weiterhin die Ras-Raf-Signalkaskade bzw. Ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade aktivieren, die eine wichtige Rolle in der IL-6-vermittelten Zellproliferation spielt.

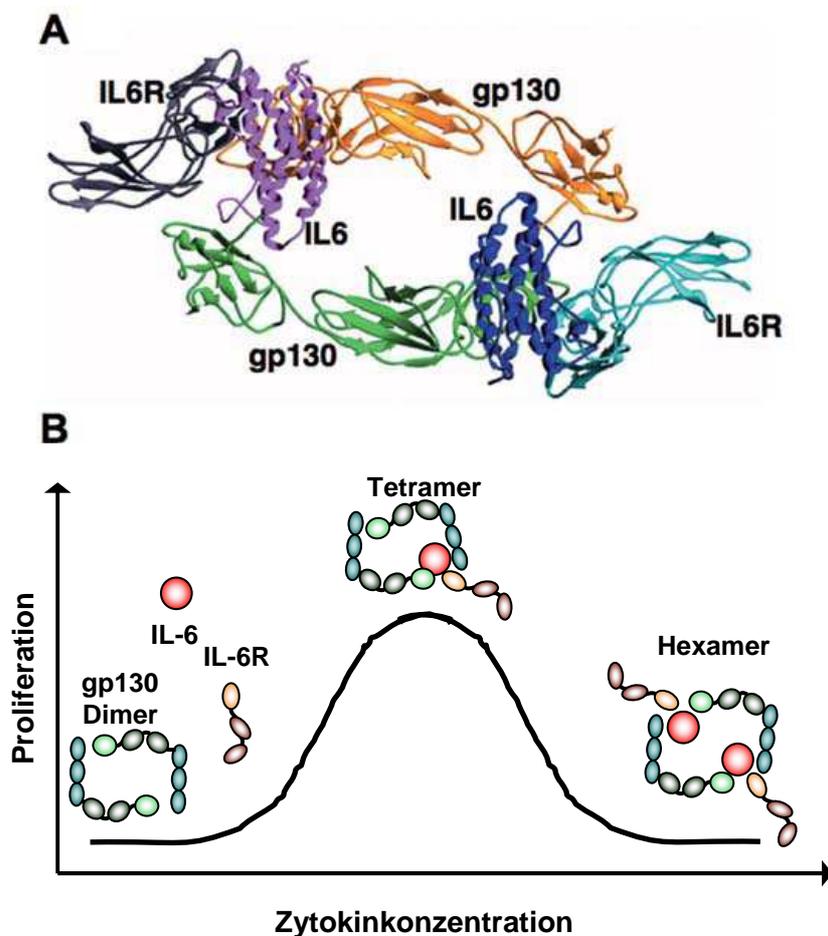


**Abb. 1.4: IL-6-vermittelte Signalkaskaden [21, 22].** Der Bindung von IL-6 an den IL-6R folgt eine Liganden-induzierte Homodimerisierung des gp130. Diese Aktivierung löst sowohl den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg als auch die Ras/Raf/MAP-Kinase-Kaskade aus. Nach gp130-Dimerisierung schließt sich die Phosphorylierung gp130-assoziiierter Tyrosinkinassen (JAK) und damit die Aktivierung der STAT-Faktoren (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) an [2]. Diese phosphorylierten, monomeren Einheiten dimerisieren und wandern zur Genregulation in den Nukleus ein. IL-6 kann weiterhin nach Phosphorylierung der JAK die Ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade aktivieren und nachfolgend die Expression bestimmter Gene beeinflussen.

## 1 EINLEITUNG

Die Stöchiometrie des Komplexes aus IL-6, IL-6R und gp130 konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. IL-6 besitzt drei verschiedene Rezeptor-Bindestellen, was einen aktiven Komplex aus einem Molekül IL-6, einem Molekül IL-6R und zwei Molekülen gp130 vermuten lässt. Das einfachste Modell wäre demnach ein Tetramer [12].

Jedoch zeigten Boulanger *et al.* 2003 in einem Kokristallisationsexperiment, dass die Proteine IL-6, IL-6R und gp130 in einem Verhältnis von 2:2:2 miteinander interagieren (Abb. 1.5, A) [23]. Den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe Rose-John nach formieren IL-6, IL-6R und ein gp130-Homodimer einen tetrameren Komplex [12]. Aufgrund der Symmetrie des gp130-Homodimers kann das aktive Tetramer bei hohen IL-6/IL-6R-Konzentrationen ein weiteres IL-6/IL-6R-Paar binden. Dies führt zu einer Tetramer-Hexamer-Verschiebung. Diese inaktive, hexamere Struktur führt zu einer Verringerung der biologischen Antwort (Abb. 1.5, B) [12].



**Abb. 1.5: IL-6/sIL-6R/gp130-Komplex** [16, 23]. **A:** Die Kristallstruktur des hexameren humanen IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes wurde 2003 von Boulanger *et al.* gelöst [23]. Der Komplex besteht aus je zwei Molekülen IL-6 (blau, violett), IL-6R (türkis, grau) und gp130 (grün, orange). **B:** Stöchiometrie des IL-6-Rezeptorkomplexes. In Abwesenheit des Liganden liegt gp130 als Homodimer vor. In Anwesenheit des IL-6 und sIL-6R bildet sich ein aktiver tetramerer Komplex, der bei Überschuss an IL-6/IL-6R-Dimeren in einen inaktiven hexameren Zustand übergeht.

### 1.3 IL-6 und der sIL-6R im Kontext von Erkrankungen

Deutlich von der Norm abweichende Konzentrationen an IL-6 und löslichem IL-6R wurden bei einer Vielzahl von Krankheiten nachgewiesen. In Tabelle 1.2 sind einige Erkrankungen exemplarisch aufgelistet.

**Tab. 1.2: Level an sIL-6R bei ausgewählten Krankheiten (nach [2])**

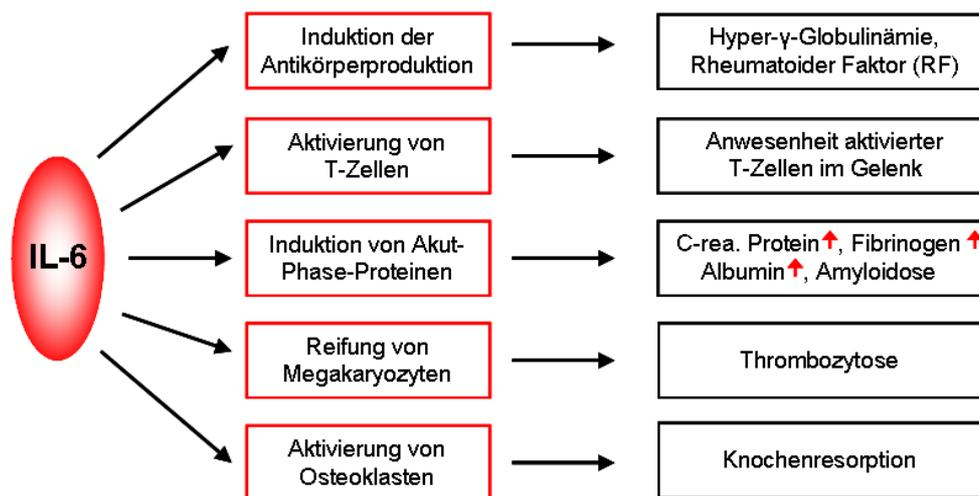
| Krankheit             | C <sub>sIL-6R</sub> * | Anmerkungen   | Quelle |
|-----------------------|-----------------------|---|--------|
| Rheumatoide Arthritis | ▲                     | Erhöhte sIL-6R-Konzentration korreliert mit Maß an Leukozyteneinwanderung und Gelenkzerstörung  | [2]    |
| Sepsis                | ▼                     | Verringerte Serumkonzentrationen an sIL-6R im Vergleich zu gesunden Personen                    | [24]   |
| Asthma                | ▲                     | Erhöhte sIL-6R-Serumkonzentrationen und Verstärkung des Effekts nach Allergenkontakt            | [25]   |
| Morbus Crohn          | ▲                     | Erhöhtes sIL-6R-Level, Beschleunigung des Krankheitsverlaufes wird vermutet                     | [2]    |
| Multiple Sklerose     | ▲                     | Erhöhter sIL-6R-Spiegel korreliert mit Schweregrad der Erkrankung                               | [26]   |
| Depression            | ▼                     | Deutlich verringerte sIL-6R-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis (CFS)                     | [27]   |
| Brustkrebs            | ▼                     | Verringertes Serumlevel an sIL-6R im Vergleich zu gesunden Personen, Erhöhung nach Operation    | [28]   |
| Multiples Myelom      | ▲                     | Zirkulierendes sIL-6R-Level korreliert mit Schweregrad der Erkrankung                           | [29]   |
| HIV-Infektion         | ▲                     | Virale Infektion unterstützt sIL-6R-Freisetzung, Mitwirkung an AIDS-bedingten Symptomen möglich | [30]   |

\* = Konzentration an sIL-6R erhöht oder erniedrigt gegenüber dem Normalwert

Es wird diskutiert, wie stark der sIL-6R an der Regulation von IL-6-Antworten beteiligt ist und welche Stellung dieser in Krankheitsverläufen einnimmt [2]. Die genaue biologische Bedeutsamkeit innerhalb einer Krankheitssymptomatik bleibt meist unklar.

Am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (RA) wurde die Rolle des IL-6 bzw. IL-6R und die biologische Aktivität des IL-6/IL-6R-Komplexes im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der Patienten untersucht [31]. RA ist eine inflammatorische Krankheit, die von Blutarmut, Thrombozytose, entzündlichen Erosionen der Gelenke und der Anwesenheit eines Anti-Immunglobulin-Autoantikörpers (Rheumatoider Faktor, RF) begleitet wird (Abb. 1.6) [5]. Die Erkrankung ist ebenfalls mit hohen Konzentrationen an Akut-Phase-Proteinen assoziiert.

## 1 EINLEITUNG



**Abb. 1.6: Funktionen und Wirkungen des IL-6 am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (nach [5]).** C-rea. Protein steht für C-reaktives Protein. Die roten Pfeile deuten eine erhöhte Konzentration der entsprechenden Komponente an.

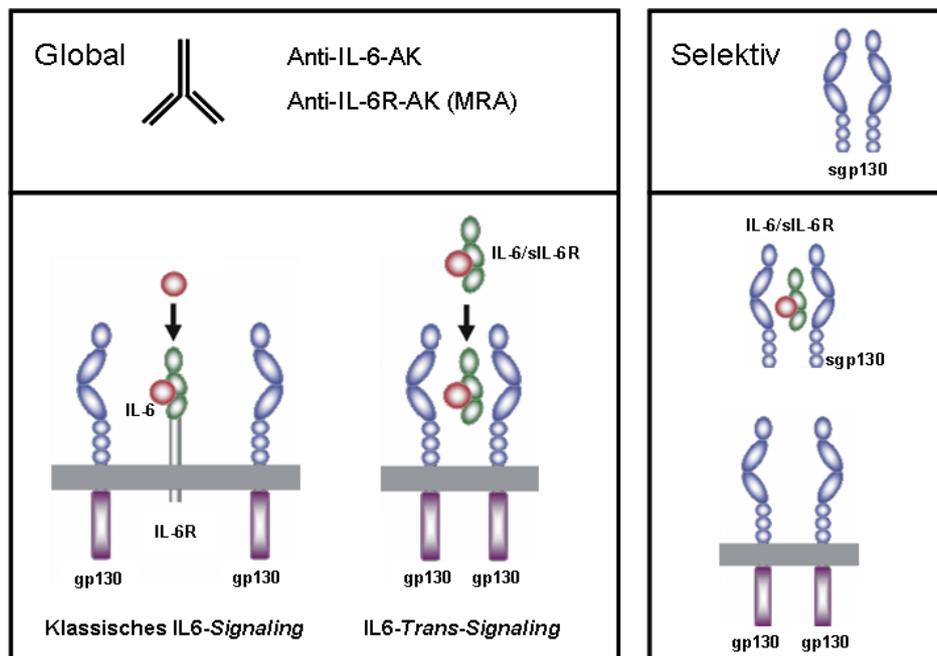
Die Analyse der Gelenkflüssigkeiten von RA-Erkrankten ergab stark erhöhte IL-6- und sIL-6R-Konzentrationen, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten. Da die in Gelenken vorkommenden Zelltypen (Chondrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) nicht zur IL-6R- bzw. sIL-6R-Produktion befähigt sind, verursachen eingedrungene Leukozyten die erhöhte synoviale sIL-6R-Konzentration und ermöglichen das *IL-6-Trans-Signaling* in Zellen der arthritischen Gelenke.

Eine mögliche Therapie von RA-Patienten stellt die gezielte Unterdrückung der IL-6-Produktion oder Inhibition der IL-6-Funktionen durch Anwendung neutralisierender Anti-IL-6-AK oder Anti-IL-6R-AK dar (Abb. 1.7) [5]. Erste Versuche, IL-6 mit einem monoklonalen Antikörper zu blockieren, führten zur Bildung von Immunkomplexen, wodurch sich die Halbwertszeit von IL-6 verlängerte. Eine gewünschte Inhibition der IL-6-Aktivität durch diesen Antikörper blieb aus [32].

Das schweizer Unternehmen *Roche Pharma AG* entwickelte gemeinsam mit seinem Tochterunternehmen *Chugai* das Medikament Tocilizumab zur Behandlung von RA. Tocilizumab (Actemra, MRA) ist ein gegen den IL-6R gerichteter monoklonaler Antikörper, welcher die IL-6R-vermittelte Signaltransduktion inhibiert. Tocilizumab bindet sowohl den löslichen als auch an membrangebundenen IL-6-Rezeptor spezifisch und unterbindet somit die IL-6-Wirkung. Der Antikörper wird derzeit zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit mittelschwerer bis schwerer RA eingesetzt. Im Jahre 2008 erhielt das Medikament in Japan die Zulassung für klinische Anwendungen, in Europa folgte dessen Einführung Anfang 2009. Bei einer Behandlung von RA-Patienten mit Tocilizumab erfolgt die Verabreichung alle zwei Wochen intravenös bei einer Dosis von 2 - 8 mg MRA pro kg Körpergewicht. Das

## 1 EINLEITUNG

Medikament zeigt eine hoch effektive klinische Wirksamkeit und stellt die einzige, klinisch getestete Anti-Zytokin-Therapie dar [33].



**Abb. 1.7: Strategien zur Behandlung von Krankheiten wie RA (nach [17, 34]). Links:** Eine Blockade der Funktionen des IL-6 und des IL-6R kann durch Anwendung blockierender Antikörper (Anti-IL-6-AK bzw. Anti-IL-6R-AK) erfolgen. **Rechts:** Selektive Blockade der IL-6/sIL-6R-vermittelten Signalgebung durch Anwendung spezifischer sIL-6R-Antagonisten, z. B. sgp130. Es kommt zur Hemmung der IL-6-vermittelten Signalgebung, die durch den sIL-6R, nicht aber durch den Membran-ständigen IL-6R ausgelöst wird. (Weitere Details siehe auch Abb. 1.3).

Zunächst konnten keine schwerwiegenden infektiösen oder toxischen Nebenwirkungen des Tocilizumab nachgewiesen werden, lediglich eine Erhöhung des Blutcholesterolspiegels konnte 24 Wochen nach der Behandlung beobachtet werden [35].

Im März 2009 veröffentlichte der Konzern *Chugai* auf dessen Internetseite Studien über den Tod von fünfzehn mit Tocilizumab behandelten Patienten. Bei 221 weiteren Patienten traten schwere Nebenwirkungen auf. Ein Zusammenhang zu der Anwendung von Tocilizumab wurde nicht ausgeschlossen.

Eine weitere mögliche Strategie, die IL-6/sIL-6R-vermittelte Signalgebung selektiv zu blockieren, liegt in der Anwendung von sIL-6R-Antagonisten, z. B. sgp130 (Abb. 1.7, rechts). Lösliches gp130 (sgp130) stellt eine durch alternatives Spleißen gebildete, lösliche Form des gp130 dar. Das sgp130 kann die IL-6-Signalgebung, die durch den löslichen IL-6R ausgelöst wird, hemmen, nicht aber die durch den Membran-ständigen IL-6R hervorgerufene Signalweiterleitung. Sgp130 stellt einen weiteren potentiellen, therapeutischen Ansatzpunkt zur Blockade der IL-6R-Aktivität und zur Behandlung von RA-Patienten dar [16, 31].

## 1.4 Aptamere

Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren (ssDNA oder ssRNA), welche ausgewählte Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können. Der Begriff „Aptamer“ leitet sich aus dem lateinischen Wort „aptus“ für „passend“ und dem griechischen Wort „meros“ für „Teilchen“ ab. Erstmals geprägt wurde der Begriff des Aptamers 1990 durch die Arbeitsgruppe von Andrew D. Ellington und Jack W. Szostak, dem diesjährigen Medizin-Nobelpreisträger. Sie bezeichneten damit RNA-Moleküle, welche an willkürlich ausgewählte organische Farbstoffe binden konnten. Die Isolation dieser RNA-Spezies erfolgte durch *in vitro* Selektion aus einer komplexen, randomisierten Bibliothek mit einer Sequenzdiversität von etwa  $10^{15}$  verschiedenen RNA-Molekülen (Tab. 1.3). Seither wurden mehr als 2.000 wissenschaftliche Berichte über Aptamere und deren Herstellung veröffentlicht [36].

**Tab. 1.3: Ausgewählte Aptamere mit Spezifität für Zielmoleküle verschiedener Substanzklassen**

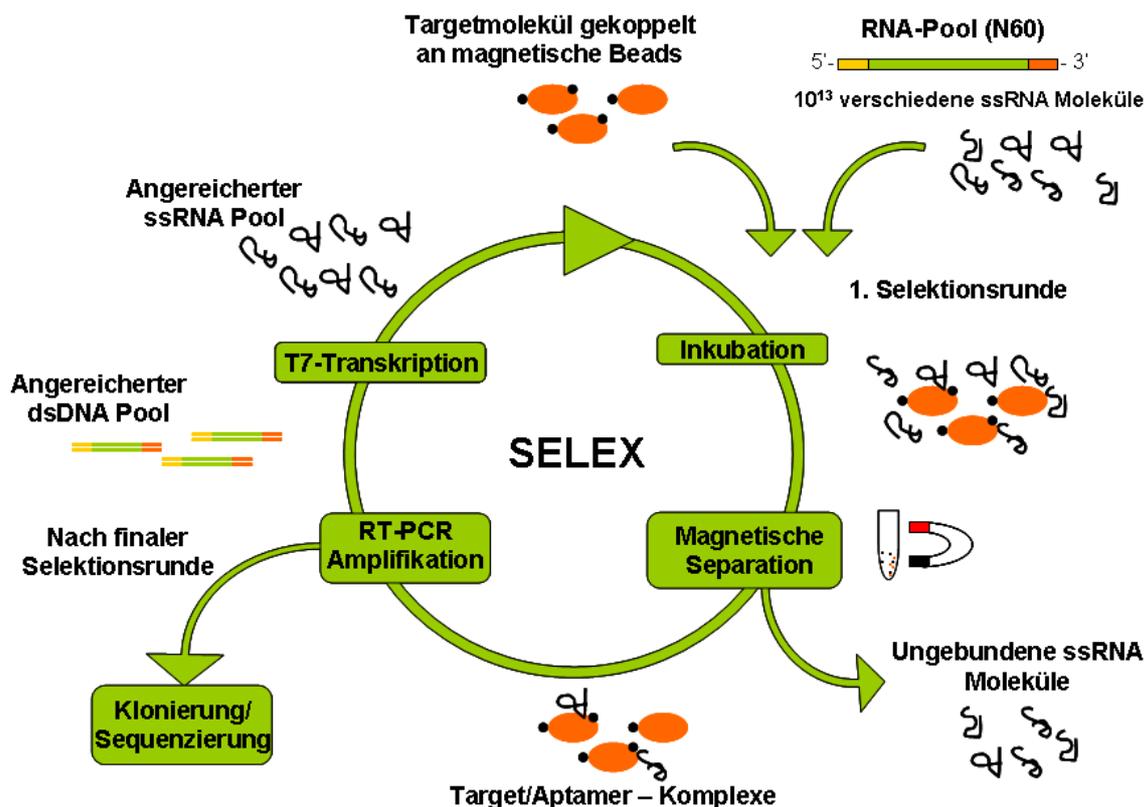
| Substanzklasse | Target                                   | Aptamertyp | $K_d$ -Wert [M]           | Quelle   |
|----------------|--|------------|---------------------------|----------|
| Ionen          | $Zn^{2+}$                                | DNA        | $1,5 \times 10^{-5}$      | [37]     |
| Nukleotide     | Adenosintriphosphat (ATP)                | DNA        | $6,0 \times 10^{-6}$      | [38]     |
| Fluorophore    | Sulforhodamin B                          | RNA        | $3,1 \times 10^{-7}$      | [39]     |
| Antibiotika    | Moenomycin A                             | RNA        | $3,0 \times 10^{-7}$      | [40]     |
| Nukleinsäuren  | TAR-Hairpin in HIV-1 mRNA                | RNA        | $4,4 \times 10^{-9}$      | [41]     |
| Zytokine       | <i>Vascular Epithelial Growth Factor</i> | RNA        | $0,5-1,5 \times 10^{-10}$ | [42, 43] |
| Peptide        | Neuropeptid Y (NPY)                      | DNA        | $0,3-1,0 \times 10^{-6}$  | [44]     |
| Proteine       | HIV Tat-Protein                          | RNA        | $1,2 \times 10^{-10}$     | [45]     |
| Zellen         | Burkitt Lymphoma B Zellen                | DNA        | $4,9 \times 10^{-8}$      | [46]     |

Aufgrund der dreidimensionalen Faltung dieser Nukleinsäuren können verschiedenartige Zielstrukturen erkannt und gebunden werden, wie beispielsweise Aminosäuren, Antibiotika, Peptide, Proteine, Viren oder sogar ganze Zellen.

Je nach Anwendung sollten Aptamere möglichst vorteilhafte Eigenschaften besitzen, wie beispielsweise eine hohe Affinität zum Zielmolekül, eine schnelle Assoziationsgeschwindigkeit und eine geringe Dissoziationskonstante, typischerweise im picomolaren bzw. unteren nanomolaren Bereich [47].

## 1.5 *In vitro* Selektion von Aptameren

Im Jahre 1990 veröffentlichten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Studien über die Anreicherung kleiner Nukleinsäuremoleküle mit definierten Funktionen: A. Ellington und J. Szostak isolierten RNA-Moleküle aus einer randomisierten Bibliothek, die verschiedene organische Farbstoffe binden konnten [48]. Im selben Jahr gelang der Arbeitsgruppe um D. Robertson und G. Joyce nach Mutation des Tetrahymena Ribozyms, ein selbstspaltendes Gruppe I Intron, die Anreicherung eines neuen katalytisch aktiven Ribozyms, welches, im Vergleich zum Wildtyp-Ribozym, DNA-Substrate spalten konnte [49]. Nahezu zeitgleich veröffentlichten C. Tuerk und L. Gold Studien über die Selektion von RNA-Liganden mit Spezifität für die DNA-Polymerase des T4-Bakteriophagen [50]. Sie bezeichneten diesen kombinatorischen *in vitro* Selektionsprozess als **SELEX**: Systematische Evolution von Liganden durch **EX**ponentielle Anreicherung (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8:** *In vitro* Selektionsverfahren (SELEX). Dargestellt ist ein *in vitro* Selektionszyklus zur Anreicherung von RNA-Aptameren spezifisch für ein an magnetische Partikel gekoppeltes Zielmolekül. Zu Beginn der ersten Selektionsrunde erfolgt die Inkubation einer RNA-Bibliothek hoher Diversität (etwa  $10^{13}$  verschiedene Moleküle) mit dem an magnetischen Partikeln immobilisierten Zielmolekül. Nach Abtrennung von nicht-bindenden Nukleinsäuren mittels magnetischer Separation und Waschschritten werden bindende RNA-Spezies durch Erhitzen eluiert und mit Hilfe einer RT-PCR-Reaktion amplifiziert. Eine sich anschließende T7-Transkription bildet den Übergang zur folgenden Selektionsrunde. Nach etwa 6 – 20 dieser iterativen Zyklen kann die angereicherte Bibliothek kloniert und sequenziert werden.

## 1 EINLEITUNG

Dem Verlauf der natürlichen Evolution, d. h. einer Abfolge von Variation, Selektion und Replikation [50], ähnelnd, setzt sich das SELEX-Verfahren aus iterativen Zyklen der folgenden drei Teilschritte zusammen: die Inkubation der Nukleinsäure-Bibliothek mit dem Zielmolekül, die Abtrennung bindender von nicht-bindenden Nukleinsäuren und schließlich die Vervielfältigung bindender Spezies. Erfahrungsgemäß können hoch affine und spezifische Aptamere nach sechs bis zwanzig dieser iterativen Selektionszyklen angereichert werden. In der Abbildung 1.8 ist exemplarisch ein Zyklus zur Selektion von RNA-Aptameren für ein an magnetischen Partikeln immobilisiertes Zielmolekül dargestellt.

Einen sehr kritischen Schritt während des SELEX-Prozesses stellt die Abtrennung bindender Nukleinsäure-Spezies von Molekülen dar, die nicht mit dem Target interagieren. Jedes Verfahren, das eine Separation freier Nukleinsäuren vom Komplex ermöglicht, kann für diesen Anreicherungsprozess angewandt werden [51]. Eine häufig gewählte und einfache Methode ist die Filtration der RNA-Protein-Komplexe durch Nitrozellulosemembranen, entwickelt von Pristoupil *et al.* [52]. Der Nachteil liegt in der eingeschränkten Anwendbarkeit dieser Filtermembranen für kleine Moleküle und Peptide. Auch die Gefahr einer möglichen Anreicherung Filter-bindender Spezies muss oftmals durch starke Präselektionen bewältigt werden.

Als weitere mögliche Separationstechniken kommen beispielsweise die Kapillarelektrophorese [53], die Affinitätschromatographie [40], die native Gelelektrophorese [54], das *UV-Cross-Linking* [55], die Zentrifugation [56], die Technik der Durchflussszytometrie [57] sowie das oben beschriebene Verfahren der magnetischen Separation zum Einsatz [58] (Abb. 1.8). Die Abtrennung nicht-bindender Nukleinsäuren von bindenden Spezies durch Anwendung magnetischer Partikel ist eine schnelle und effektive Methode, bei deren Durchführung viele Zwischenschritte wie Zentrifugation, Filtration oder Gelelutionen entfallen. Erfahrungsgemäß verringert sich auch die Anzahl der Selektionszyklen zur Anreicherung bindender Spezies beispielsweise im Vergleich zur Filtration über Nitrozellulosemembranen [51].

## 1.6 Aptamere versus Antikörper

Die Ausbildung einer definierten dreidimensionalen Struktur befähigt Aptamere zu einer hoch affinen und spezifischen Bindung an Zielmoleküle, die der Bindung von Antikörpern ähnelt. Aptamere stellen eine potente Alternative zu monoklonalen Antikörpern in Bereichen der Forschung, Therapie und Diagnostik dar.

So besitzen sie vergleichbare, vielleicht sogar vorteilhaftere Eigenschaften, denn Aptamere zeigten bislang keine Toxizität und keine oder nur geringe Immunogenität. In präklinischen Studien am Tiermodell konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden, selbst bei Einsatz des therapeutischen Aptamers in 1.000fachem Überschuss im Vergleich zur späteren Anwendungsdosis [59]. Vorteilhaft wirkt sich die kostengünstige Synthese der Aptamere in großen Mengen und in hohem Reinheitsgrad aus, nicht zuletzt begründet in ihren geringen Größe (5-40 kDa) [60].

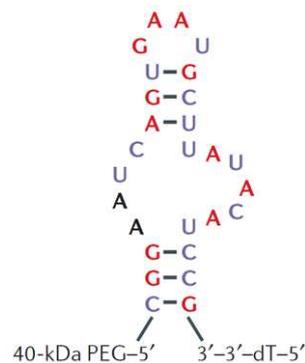
Chemische Modifikationen führen zu einer erhöhten Stabilität und damit auch Bioverfügbarkeit. Hohe Temperaturen von bis zu 90 °C erscheinen über einen längeren Zeitraum hinweg nicht problematisch. Einige vorteilhafte Eigenschaften der Aptamere gegenüber Antikörpern sind in Tabelle 1.4 zusammengefasst.

**Tab. 1.4: Einige Vorteile der Aptamere gegenüber Antikörpern (nach [61])**

| Aptamere   | Antikörper   |
|--|--|
| Selektion <i>in vitro</i>  | Selektion erfordert ein biologisches System  |
| Große Vielfalt chemischer Modifikationen möglich   | Limitierte Möglichkeit zur chemischen Modifikation des Moleküls                    |
| Batch-unabhängige, gleichbleibende Aktivität   | Batch-abhängige, variierende Aktivitäten   |
| Keine/geringe Immunogenität  | Vorhandene Immunogenität   |
| Unbegrenzte Beständigkeit  | Limitierte Beständigkeit   |
| Rückfaltung in ursprüngliche Konformation nach Hitzeeinwirkung                                   | Temperatursensitivität und irreversible Konformationsänderung nach Hitzeeinwirkung |
| Entwicklung Aptamer-spezifischer Antidotes zur Inhibition bzw. Regulation der Wirkstoffaktivität | Keine rationelle Methode zur Inhibition bzw. Regulation der Antikörperaktivität    |

## 1.7 Aptamere als Therapeutika

Aptamere haben in der Biologie und Medizin während der letzten Jahre einen immer größeren Einfluss erlangt und bilden eine vielversprechende Molekülklasse neuartiger Therapeutika und Diagnostika. Im Jahre 2004 wurde erstmals eine Aptamer-basierte Verbindung für eine klinische Anwendung zugelassen: das *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-spezifische Aptamer Macugen<sup>®</sup> (Abb. 1.9). Bis zu diesem Zeitpunkt war die Anwendung der Aptamere als Therapeutika durch eine starke Sensitivität gegenüber Nukleasen, eine eingeschränkte zelluläre Aufnahme und eine schnelle renale Resorption limitiert. Um diese Problemstellung zu bewältigen, werden die Aptamere modifiziert. Das Einfügen von Fluoro- oder Aminogruppen am 2'-OH-Ende der Pyrimidine, das Anfügen einer dT-Kappe am 3'-Ende der Nukleinsäuren oder das Erzeugen von Nuklease-resistenten Enantiomeren, sogenannten Spiegelmeren, können die Stabilität gegenüber Nukleasen drastisch verbessern. Die Kopplung der Aptamere an Cholesterol bzw. Polyethylenglykol (PEG) oder gar eine Multimerisierung erhöhen deren Bioverfügbarkeit und verzögern den Vorgang der renalen Ausscheidung [62].



**Abb. 1.9: Das Aptamer-basierte Therapeutikum Macugen<sup>®</sup> [62].** Gezeigt ist die Sequenz und vorhergesagte Sekundärstruktur des VEGF-spezifischen Aptamers. In rot sind 2'-Methoxypurine und in blau 2'-Desoxy-2'-fluoro-modifizierte Pyrimidinbasen dargestellt. Am 5'-Ende des Aptamers wurde ein 40 kDa großer Polyethylenglykolrest (PEG) angefügt. Zum Schutz gegenüber Exonukleasen wurde das 3'-Ende um eine 3'-3'-dT-Kappe erweitert. Post-selektiv wurden alle 2'-OH-Gruppen der Purine durch 2'-Methoxygruppen ersetzt mit Ausnahme der Nukleotide an den Positionen 4 und 5. Somit blieben lediglich zwei der 27 Nukleotide unverändert [63].

Der medizinische Einsatz von Aptameren als Medikamente ist derzeit auf das unter dem Namen Macugen<sup>®</sup> oder Pegaptanib bekannte, chemisch stark modifizierte RNA-Aptamer beschränkt. Es wird zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt [63]. Bei Patienten mit AMD wird der Wachstumsfaktor VEGF in Zellen des retinalen Pigmentepithels und der Aderhaut verstärkt produziert. Die Folgen sind eine

## 1 EINLEITUNG

intensivere Neoangiogenese und Neovaskularisierung des Auges und ein zunehmender Funktionsverlust der Netzhautzellen im Bereich des sogenannten gelben Flecks, wodurch die Sehfähigkeit stark beeinträchtigt wird.

Das Anti-VEGF-Aptamer Macugen<sup>®</sup> bindet hoch spezifisch an die pathogene Isoform VEGF<sub>165</sub> und blockiert die Interaktion dieses Wachstumsfaktors mit dessen VEGF-Rezeptor. Dies führt zur Inhibition der VEGF-Aktivität, zur Verringerung der Neovaskularisierung des Auges und zur Verzögerung des Verlustes der Sehfähigkeit. Die Therapie der AMD mittels Macugen<sup>®</sup> erfolgt alle sechs Wochen intravitreal, d. h. durch direkte Injektion von 0,3 mg des Wirkstoffes in den Glaskörper des betroffenen Auges [63].

Derzeit befinden sich weitere Aptamere in (prä-)klinischen Studien (Tab. 1.5). AS1411 bindet beispielsweise an Nukleolin, ein Kernprotein aller Körperzellen, das auch auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen wurde. Die Bindung des Aptamers AS1411 an Nukleolin führt zur Internalisierung der Interaktionspartner und einer Anti-Proliferationsantwort [62].

**Tab. 1.5: Übersicht über einige therapeutische Aptamere in (prä-)klinischen Studien**

| Aptamer | Zielmolekül                                  | Anwendung  | Quelle |
|---------|--|--|--------|
| AS1411  | Nukleolin                                    | Anti-proliferierender Effekt auf Krebszellen   | [64]   |
| ARC127  | <i>Platelet derived Growth Factor</i> (PDGF) | Inhibition der PDGF-vermittelten Zellproliferation und Angiogenese                           | [61]   |
| RB006   | Faktor IXa                                   | Inhibition der Thrombin-Produktion und Inhibition der Koagulation                            | [65]   |
| ARC183  | Thrombin                                     | Antikoagulans während Bypass-Operationen   | [61]   |
| 1d40    | L-Selektin                                   | Blockade L-Selektin-vermittelter Lymphozytenwanderung und Gewebeschädigung durch Neutrophile | [61]   |

Mit der fortschreitenden Aufklärung einer Vielzahl zellulärer biologischer Prozesse nimmt die Bedeutung und Anwendung von Aptameren einen immer größeren Stellenwert ein. Aptamere finden dabei ihren Weg aus dem Reagenzglas hin zu interessanten, molekularbiologischen Werkzeugen der Medizin, Diagnostik, Biotechnologie und der aktuellen Forschung [66].

### 2 Zielsetzung

Zytokine und deren Rezeptoren haben großen Einfluss auf die Entwicklung und Koordination des menschlichen Immunsystems [67]. Eines dieser Zytokine, das Interleukin-6, spielt insbesondere bei Entzündungsreaktionen eine wesentliche Rolle. Es stimuliert eine Vielzahl von Zellen über seinen Interleukin-6-Rezeptor, welcher in löslicher oder membrangebundener Form existiert. Insbesondere eine Dysregulation der löslichen Form (sIL-6R) kann zu Immunerkrankungen führen oder diese beeinflussen [67], wie beispielsweise den sich aus einer chronischen Darmerkrankung entwickelten Darmkrebs oder die Rheumatoide Arthritis. Ein neues therapeutisches Prinzip zur Behandlung dieser Krankheiten durch selektive Hemmung der IL-6/IL-6R-vermittelten Signalgebung könnte in der Anwendung von Aptameren liegen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lag in der Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren, welche den IL-6R hoch affin und spezifisch binden konnten. Nach Anreicherung der Aptamere durch das Verfahren der *in vitro* Selektion sollten detaillierte Untersuchungen zu den RNA-Rezeptor-Wechselwirkungen durchgeführt werden. Mit Hilfe von Sekundärstrukturvorhersagen, Mutationsanalysen und der sogenannten *Damage Selection* sollten die RNA-Aptamere verkürzt und ein minimiertes Bindungsmotiv identifiziert werden. In *in vitro* Kompetitionsstudien sollten die Funktionalität und das Bindungsverhalten der selektierten RNA-Aptamere an den IL-6R in An- und Abwesenheit der natürlichen Liganden IL-6, gp130 und Hyper-IL-6 untersucht werden.

Mit Hilfe geeigneter Zellen und des Verfahrens der Durchflusszytometrie sollte schließlich die Fragestellung geklärt werden, ob die Aptamere den nativen IL-6R auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen erkennen konnten. Welches Potential in den Aptameren steckt und ob die Aptamere die biologische Aktivität des IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes und somit die Zellproliferation beeinflussen, sollte in weiterführenden Studien analysiert werden.

## 3 Material

### 3.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und AppliChem (Darmstadt) käuflich in p.A.-Qualität bezogen.

### 3.2 Puffer, Lösungen und Medien

Tab. 3.1: Allgemeine Puffer und Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren

| Puffer                           | Zusammensetzung  |
|----------------------------------|--|
| Alkalischer Hydrolysepuffer (2x) | 100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 9,2; 2 mM EDTA   |
| Aminohexansäure-Puffer           | 20% Methanol; 40 mM Aminohexansäure (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )  |
| Ammoniumpersulfat                | 10% (w/v) APS in aqua dest.  |
| cDNA-Synthesepuffer (5x)         | 250 mM Trisacetat; pH 8,4 (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> );<br>375 mM Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK);<br>40 mM Magnesiumacetat (Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ) |
| CIAP-Puffer (10x)                | 100 mM Tris-HCl; pH 7,5; 100 mM MgCl <sub>2</sub>  |
| DNA-Probenpuffer (6x)            | 50% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) SDS;<br>0,1% (w/v) Orange G   |
| DNA-Sequenzierungspuffer (5x)    | <i>BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer</i><br>Applied Biosystems (Zusammensetzung geschützt)   |
| Hybridisierungspuffer (10 x)     | 200 mM Tris-HCl; pH 8,0; 500 mM NaCl;<br>10 mM EDTA  |
| Klenow-Puffer (10 x)             | 500 mM Tris-HCl; pH 8,0; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>10 mM DTT  |
| PCR-Puffer B (10x)               | 800 mM Tris-HCl; pH 8,8; 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ;<br>0,2% (w/v) Tween-20   |
| PNK-Puffer A (10 x)              | 500 mM Tris-HCl; pH 7,6; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA  |
| RNA-Elutionspuffer               | 0,3 M CH <sub>3</sub> COONa; pH 5,2  |
| RNA-Ladepuffer (2 x)             | 95% Formamid; 0,025% (w/v) SDS;<br>0,025% (w/v) Bromphenolblau; 0,025% (w/v)<br>Xylencyanol FF; 0,025% (w/v) Ethidiumbromid;<br>0,5 mM EDTA  |
| RNA-Sequenzierungspuffer         | 20 mM Natriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> Na); pH 5,0;<br>1 mM EDTA; 7 M Harnstoff   |

### 3 MATERIAL

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| T4-RNA-Ligase-Puffer (10 x) | 50 mM Tris-HCl; pH 7.8; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>10 mM DTT; 1 mM ATP |
| TBE (5x)                    | 445 mM Tris-HCl; 445 mM Borsäure; 10 mM<br>EDTA                          |
| Transkriptionspuffer (5x)   | 200 mM Tris-HCl; pH 7,9  |

**Tab. 3.2: Allgemeine Puffer und Lösungen zur Proteinanalyse**

| Puffer                           | Zusammensetzung  |
|----------------------------------|--|
| BCIP-Lösung (10 x)               | 0,5% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) in DMF  |
| Biotinylierungsreagenz           | 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz  |
| <i>Coomassie</i> -Entfärbelösung | 10% (v/v) Eisessig   |
| <i>Coomassie</i> -Färbelösung    | 0,25% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> ;<br>45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure                    |
| Dot Blot AK-Puffer               | 2,5% Magermilchpulver in 1x PBS  |
| Dot Blot AP-Substratlösung       | 1x NBT; 1x BCIP in Dot Blot Reaktionspuffer  |
| Dot Blot Blockpuffer             | 5% Magermilchpulver in 1x PBS  |
| Dot Blot Reaktionspuffer         | 100 mM Tris; pH 9,5; 4 mM MgCl <sub>2</sub>  |
| NBT-Lösung (10 x)                | 0,1% (w/v) NBT   |
| PBS (10x)                        | 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;<br>65 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 |
| Sammelgelpuffer (4x)             | 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,4% SDS   |
| SDS-Laufpuffer (5x)              | 0,125 M Tris; pH 8,3; 0,96 M Glycin; 0,5% SDS  |
| SDS-Proteinladepuffer (2x)       | 125 mM Tris-HCl; pH 6,8; 4% (w/v) SDS;<br>40% (v/v) Glycerin; 0,002% (w/v)<br>Bromphenolblau; 4 mM DTT             |
| Trenngelpuffer (4x)              | 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,4% SDS   |

**Tab. 3.3: Puffer und Lösungen zur Aptamersélection**

| Puffer                 | Zusammensetzung   |
|------------------------|---|
| Kopplungspuffer A (1x) | 1x PBS; 1 µg BSA/µl; pH 7,4                             |
| Kopplungspuffer B (1x) | 1,25x PBS; 1 µg BSA/µl; pH 7,4                          |
| Kopplungspuffer C (1x) | 1,25x PBS; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 µg BSA/µl; pH 7,4 |

### 3 MATERIAL

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| PBS (10 x)              | 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ;<br>15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 |
| Selektionspuffer A (1x) | 1x PBS; pH 7,4   |
| Selektionspuffer B (1x) | 1x PBS; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4  |
| Selektionspuffer C (1x) | 1x PBS; 12 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4   |
| 1x Trispuffer A         | 100 mM Tris; pH 7,4  |
| Tris/HCl (10 x)         | 1 M Tris-HCl; pH 7,4   |

---

**Tab. 3.4: Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten**

---

| Puffer                 | Zusammensetzung   |
|------------------------|---|
| Ampicillin-Stocklösung | 50 mg Ampicillin pro ml aqua dest.  |
| DMEM                   | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (1x)<br>Standardisiertes Nährmedium zur Zellkultur<br>(Invitrogen)                                |
| FKS                    | 100% FKS  |
| LB-Medium              | 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton<br>pro 1 Liter aqua dest.  |
| Pen/Strep (100x)       | 6,25 mg Penicillin G Natriumsalz/ml;<br>10 mg Streptomycin/ml; 9 mg NaCl/ml in aqua<br>dest.  |
| Puromycin-Stocklösung  | 1 mg Puromycin pro ml aqua dest.  |
| SOC-Medium             | 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose; 2% (w/v)<br>Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt |

---

### 3.3 Enzyme

|  |               |
|--|---------------|
| Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)       | Fermentas     |
| DNase I (RNase-free)                             | Fermentas     |
| ExtrAvidin <sup>®</sup> -Alkaline Phosphatase    | Sigma         |
| FIREPol <sup>®</sup> DNA Polymerase              | Solis BioDyne |
| Klenow-Fragment                                  | Fermentas     |
| RiboLock <sup>™</sup> RNase-Inhibitor            | Fermentas     |
| RNase T1   | Fermentas     |
| SuperScript III Reverse Transcriptase (Rnase H-) | Invitrogen    |

### 3 MATERIAL

|   |                       |
|---|-----------------------|
| <i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant) | Fermentas             |
| T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK)         | Fermentas             |
| T4 RNA Ligase                           | New England Biolabs   |
| T7 RNA-Polymerase                       | D. Plön [68], AG Hahn |

#### 3.4 Protein- und DNA-Standards

|   |           |
|---|-----------|
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder    | Fermentas |
| PageRuler™ Unstained Protein Ladder     | Fermentas |
| O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder | Fermentas |
| O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder       | Fermentas |
| RiboRuler™ Low Range RNA Ladder         | Fermentas |

#### 3.5 Kommerziell erhältliche Kits

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| NucleoSpin® Extract II | Machery&Nagel |
| TOPO TA Cloning® Kit   | Invitrogen    |

#### 3.6 Nukleotide und Radionukleotide

|  |                   |
|--|-------------------|
| Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)           | Roth              |
| Ribonukleotidtriphosphate (NTPs)                 | Roth              |
| Guanin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (GTPS)           | BIOLOG            |
| [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol) | Hartmann Analytic |
| [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol) | Hartmann Analytic |
| [5'- <sup>32</sup> P]-pCp (3000 Ci/mmol)         | Hartmann Analytic |

#### 3.7 Fluorophore

|   |            |
|---|------------|
| Alexa Fluor® 488 C <sub>5</sub> -Maleimid | Invitrogen |
| Alexa Fluor® 647 C <sub>2</sub> -Maleimid | Invitrogen |

#### 3.8 Allgemeine Materialien zur Aptamer-Selektion

|  |            |
|--|------------|
| Dynabeads® M-280 Streptavidin                | Invitrogen |
| Magna-Sep™ Magnetic Particle Separator       | Invitrogen |
| Sulfo-NHS-LC-Biotin (Biotinylierungsreagenz) | Pierce     |
| <i>Slide-A-Lyzer</i> -Dialysekassette        | Pierce     |

### 3 MATERIAL

## 3.9 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) oder Metabion (München) in HPLC-gereinigter Form bezogen.

**Tabelle 3.5: Verwendete Oligonukleotide (in 5'-3' - Richtung dargestellt).**

| Bezeichnung        | Sequenz des Oligonukleotids (5'-3'-Richtung)  |
|--------------------|---|
| Pool R1 (128 nt)   | AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATTCT-N60-CTTCTGGAGTTGACGTTGCTT                   |
| RT-Primer Pool R1  | AAGCAACGTCAACTCCAGAAG   |
| T7-Primer Pool R1  | AATGCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAAGAGGTCTGAGACATT   |
| T7-Primer-GG       | AATGCTAATACGACTCACTATAGG  |
| O29 (89 nt)        | TCTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGGTGGCATACTGTCGTCCAATGTGAAATGTCGTGTGTGCTCGGGCGAGTCGTCTG     |
| R24 (90 nt)        | TCTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGGGATTGTTGAGTGGTGC GAAACGCTTTTGCCCCACTTCGCGTCGGGCGAGTCGTCTG |
| RT-Primer O29/R24  | CAGACGACTCGCCCGA  |
| T7-Primer O29/R24  | TCTAATACGACTCACTATAGGGAGGACGATGCGG  |
| M13 reverse Primer | CAGGAAACAGCTATGACC  |
| M13 forward Primer | TGTAAAACGACGGCCAGT  |
| 16-3_A_rev         | CCCTCACCACAGCCTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCATT   |
| 16-3_B_rev         | ATTCTCTTAATATTCCCTCACCACAGCCTCCCCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_C_rev         | TCGAGGTGAAC TAGACCGTTAATTCTCTTAATATTCCCTCACCACAG CCTCCCCTATAAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGCATT     |
| 16-3_B_M1 rev      | ATTCTCTTAATATTCACTCACCACAGCCTCCCCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_B_M2 rev      | ATTCTCTTAATATTCACTCACCACAGCCTCCCCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_B_M3 rev      | ATTCTCTTAATATTCACTCACCACAGCCTCACCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_B_M4 rev      | ATTCTCTTAATATTCACTCACCACAGACTCCCCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_B_M5 rev      | ATTCTCTTAATATTCACTCAACACAGCCTCCCCTATAAGAGAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAGCATT                      |
| 16-3_B_M1 fw       | AATGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTCTTATAGGGGAGGCTGT GGTGAGTGAATATTAAGAGAAT                      |
| 16-3_B_M2 fw       | AATGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTCTTATATAGGGAGGCTGT GGTGAGTGAATATTAAGAGAAT                     |

### 3 MATERIAL

---

|              |   |
|--------------|---|
| 16-3_B_M3 fw | AATGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTCTTATAGGTGAGGCTGT<br>GGTGAGTGAATATTAAGAGAAT |
| 16-3_B_M4 fw | AATGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTCTTATAGGGGAGTCTGT<br>GGTGAGTGAATATTAAGAGAAT |
| 16-3_B_M5 fw | AATGCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTCTTATAGGGGAGGCTGT<br>GTTGAGTGAATATTAAGAGAAT |

---

### 3.10 Antikörper und Proteine

#### Anti-His-AK

Der Anti-His-Antikörper wurde käuflich von der Firma Qiagen erworben. Es handelt sich um einen murinen monoklonalen IgG1-Antikörper mit hoher Affinität und Spezifität für einen Hexa-Histidin-*Tag* [69].

#### Anti-hIL-6R-AK

Der Anti-hIL-6R-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Athena Chalaris (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen murinen monoklonalen IgG1-Antikörper mit hoher Affinität und Spezifität für den humanen Interleukin-6-Rezeptor.

#### CEACAM 1

Das rekombinante, lösliche CEACAM1 (CC1; ~ 70 kDa) besteht aus vier extrazellulären Immunglobulin-Domänen, an die sich ein C-terminaler Hexa-Histidin-*Tag* anschließt. Die Produktion des CEACAM1 erfolgte mit Hilfe von Baculoviren in Insektenzellen (Sf9). Die Glykosylierung ist nicht dem nativen Zustand entsprechend, da in Insektenzellen keine Fucosylierung möglich ist. Das Protein wurde von Dr. Andrea Horst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### FITC-konjugierter Anti-Maus-AK

Der FITC-konjugierte Anti-Maus-IgG (Vollantikörper, der Ziege entstammend) wurde käuflich von der Firma Sigma erworben.

#### Hyper-IL-6 (H-IL-6)

Hyper-IL-6 (~ 57 kDa; 408 AS) ist ein Fusionsprotein bestehend aus IL-6 und sIL-6R, welche durch einen flexiblen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind [20]. Hyper-IL-6 wurde von Professor Stefan Rose-John und Dr. Inken Lorenzen (Universität Kiel) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 3 MATERIAL

#### Interleukin-6 (IL-6)

Die Genexpression des rekombinanten IL-6 (~ 20,9 kDa; 184 AS) in *E. coli* und die Proteinreinigung wurden nach dem von Arcone *et al.* [70] und van Dam *et al.* [71] beschriebenen Verfahren durchgeführt. IL-6 wurde freundlicherweise von Professor Stefan Rose-John und Dr. Inken Lorenzen (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

#### Lösliches gp130 - Fc (sgp130Fc)

Das lösliche gp130-Fc-Fusionskonstrukt (sgp130Fc; ~ 94 kDa) stellt die extrazelluläre Region des humanen gp130 dar, welches mit der konstanten Region der schweren Kette eines humanen IgG1 fusioniert ist. Zusätzlich trägt dieses Konstrukt einen C-terminalen Hexa-Histidin-Tag [72]. Die Genexpression in COS7-Zellen und die Aufreinigung dieses Fusionsproteins wurde mittels einer Nickel-Chelat-Säule nach Jostock *et al.* durchgeführt [72]. Das Protein wurde von Professor Jürgen Scheller und Professor Stefan Rose-John (Universität Kiel) bereitgestellt.

#### Löslicher Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R)

Der humane, lösliche IL-6R (sIL-6R; ~ 50 kDa; 339 AS), ohne Transmembran- und zytoplasmatische Domäne, wurde nach Mackiewicz *et al.* oder Schooltink *et al.* in CHO-Zellen produziert [73, 74]. Dieses Protein trägt einen C-terminalen His-Tag. Die Produktion und Reinigung des sIL-6R erfolgte durch Professor Joachim Grötzinger und Dr. Inken Lorenzen der Universität Kiel.

#### Lysozym

Das Lysozym (~ 14 kDa; aus Hühnereiweiß) wurde käuflich von der Firma Roth erworben.

### **3.11 Bakterienstamm**

*E. coli* TOP10 (Invitrogen)

(Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 *DlacX74 recA1 araD139*  
 $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*)

### **3.12 Zelllinien**

Die murine Prä-B-Zelllinie BAF/3 ist eine immortalisierte, dem Knochenmark entstammende Pro-B-Zelllinie, deren Wachstum und Proliferation von der Anwesenheit des Zytokins IL-3 abhängig ist.

Das Wachstum der BAF/3-Zellen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, war von IL-6 abhängig. Begründet wird dies durch eine stabile Transfektion dieser Zellen mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. den cDNAs für gp130, IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL-6R/TNF). Die BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen waren neben der Produktion von gp130 und dem IL-6R auch zur Produktion des TNF befähigt, was für Studien dieser Arbeit jedoch nicht essentiell war. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Professor Stefan Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

## 4 Methoden

### 4.1 Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (PAA-Gele) ist in Tabelle 4.1 dargestellt ist.

**Tab. 4.1: Zusammensetzung nativer Polyacrylamidgele**

| Komponente                        | 8%ige Gele | 10%ige Gele | 15%ige Gele | 20%ige Gele |
|-----------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| TBE                               | 1x         | 1x          | 1x          | 1x          |
| Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (w/v) | 8%         | 10%         | 15%         | 20%         |
| TEMED (v/v)                       | 0,1%       | 0,1%        | 0,1%        | 0,1%        |
| APS (w/v)                         | 0,1%       | 0,1%        | 0,1%        | 0,1%        |

Die Polymerisation wurde durch Zugabe APS gestartet und war nach ca. 30 min abgeschlossen. Je nach Anwendung wurden analytische oder präparative PAA-Gele verschiedener Größen verwendet (Tab. 4.2). Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V. Nach Beendigung der PAGE wurden die Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid (4.1.4) gefärbt oder nach UV-Shadowing aus dem Gel eluiert (4.1.7; 4.1.8).

**Tab. 4.2: Größe der PAA-Gel entsprechend ihrer Verwendung**

| Anwendung        | Gelgröße                 |
|------------------|--------------------------|
| Analytisches Gel | 130 mm x 80 mm x 0,75 mm |
| Präparatives Gel | 245 mm x 180 mm x 1,5 mm |
| Sequenziergel    | 370 mm x 180 mm x 0,4 mm |

#### 4.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse und Reinigung von RNA erfolgte durch denaturierende PAGE. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäurefragmente wurden 8 – 20%ige PAA-Gele verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.1 gezeigt, wobei die denaturierende Wirkung durch Zugabe von Harnstoff (8 M) erreicht wurde.

## 4 METHODEN

Vor der Beladung des jeweiligen Gels wurden die RNA-Proben mit 2x RNA-Ladepuffer oder mit gleichem Volumen einer 10 M Harnstoff-Lösung versetzt und für 2 min bei 80 °C denaturiert. Nach sorgfältigem Spülen der Taschen wurde das Gel mit den Proben beladen und die Elektrophorese in 1x TBE durchgeführt. Bei analytischen Gelen erfolgte sowohl der Vorlauf als auch die elektrophoretische Trennung der Nukleinsäuren bei 6 W, bei präparativen PAA-Gelen bei 20 W. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte entweder unter UV-Licht nach Ethidiumbromidfärbung (4.1.4), mittels Autoradiographie (4.1.5) oder UV-Shadowing (4.1.8).

### **4.1.3 Denaturierende PAGE zur RNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von RNA, welche unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert (4.2.13) bzw. mit RNase T1 gespalten wurde (4.2.12), erfolgte mittels denaturierender PAGE. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäurefragmente wurden 15%ige oder 20%ige PAA-Gele verwendet (Tabelle 4.1; 4.1.2). Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatten mit 5%igem Dichlordimethylsilan (in Chloroform) behandelt, um später eine bessere Ablösung der Glasplatten vom Gel zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE bei 25 W. Das Gel wurde unter Vakuum oder im Trockenofen getrocknet und die radioaktiven Nukleinsäurebanden anschließend mittels Autoradiographie detektiert (4.1.5).

### **4.1.4 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid**

Ethidiumbromid (EtBr) interkaliert als kationischer, heterozyklischer Fluoreszenzfarbstoff zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch dessen Anregungsspektrum verschoben wird. Zur Färbung wurde das analytische Gel in einer Lösung von 4 µg EtBr pro ml 1x TBE für etwa 10 min geschwenkt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm konnten die Nukleinsäurebanden im Gel visualisiert werden.

### **4.1.5 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Autoradiographie**

Um kleine Mengen radioaktiv markierter Nukleinsäuren in PAA-Gelen sichtbar zu machen, wurde das Gel in 2 Klarsichtfolien eingeschlagen, auf einen Phosphorimager-Screen überführt und in einer dazugehörigen Kassette exponiert. Die Expositionsdauer richtete sich nach dem Grad der radioaktiven Markierung. Expositionszeiten von einigen Minuten bis Stunden waren üblich. Zur Identifizierung und Lokalisierung der Nukleinsäuren wurde ein Phosphorimager der Firma BioRad und die Software Quantity One<sup>®</sup> verwendet.

## 4 METHODEN

### 4.1.6 Detektion fluoreszenzmarkierter RNA

Die Fluoreszenzmarkierung von RNA wurde nach Trennung der Nukleinsäuren mittels denaturierender PAGE (10% PAA) analysiert (4.1.2). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystem Typhoon 9410 (GE Healthcare). Definiert durch die Anregungswellenlängen der Laser konnten Fluorophore mit unterschiedlichen Emmissionsspektren genutzt werden (Tab. 4.3).

**Tab. 4.3: Zur Detektion von Fluoreszenz-markierter RNA am Typhoon-Imager vermessene Fluorophore, eingesetzte Laser und deren Anregungswellenlängen.**

| Fluorophor      | Laser             | Anregungswellenlänge des Lasers |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|
| AlexaFluor® 488 | Argon-Laser       | 488 nm                          |
| AlexaFluor® 647 | Helium-Neon-Laser | 633 nm                          |

### 4.1.7 Nachweis von Nukleinsäuren mittels UV-Shadowing

Nukleinsäuren weisen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Diese Eigenschaft macht man sich bei der präparativen Reinigung von Nukleinsäuren aus PAA-Gelen zu Nutze, um diese ohne weitere Färbung identifizieren zu können.

Das präparative PAA-Gel wurde in zwei Klarsichtfolien eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte transferiert, welche mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit entsprechendem UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) wurden die Nukleinsäuren durch Fluoreszenzlöschung als dunkle Schattenbanden sichtbar. Die Nukleinsäure-Banden konnten markiert, ausgeschnitten, zerkleinert und einer Diffusionselution (4.1.8) unterzogen werden.

### 4.1.8 Diffusionselution von Nukleinsäuren aus PAA-Gelen

Zur Diffusionselution von Nukleinsäuren aus präparativen PAA-Gelen wurden die ausgeschnittenen und zerkleinerten Gelstücke mit 0,3 M Natriumacetatlösung (pH 5,4) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C und 1.000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Im Anschluss wurde das Eluat via Filtration durch eine mit silanisierter Glaswolle gestopfte Spritze von den Gelstücken abgetrennt und anschließend mit Ethanol präzipitiert (4.1.9).

## 4 METHODEN

### 4.1.9 Ethanolpräzipitation

Durch Zugabe von Natriumacetat und Ethanol können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen gefällt und somit aufkonzentriert werden. Die zu fällende Nukleinsäurelösung wurde dazu mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und dem 2,5fachen Volumen an eisgekühltem, absoluten Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 30 min bei -20 °C. Es schloss sich eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 20.000 g an. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und einer weiteren Zentrifugation für 10 min unterzogen. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet und in Wasser resuspendiert.

### 4.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am NanoDrop ND-1000 durch photometrische Messung der Optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ). Es galten dabei folgende Zusammenhänge:

$OD_{260} = 1 \rightarrow 50 \text{ ng doppelsträngige DNA (dsDNA)}/\mu\text{l}$ ,

$OD_{260} = 1 \rightarrow 40 \text{ ng einzelsträngige DNA (ssDNA)}/\mu\text{l}$ ,

$OD_{260} = 1 \rightarrow 33 \text{ ng RNA}/\mu\text{l}$ .

Das Verhältnis  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren, da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen. Ein Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  von 1,8 – 2,0 weist auf eine Reinheit der Nukleinsäuren von 70 – 95% hin. Die Berechnung der molaren Konzentrationen der Nukleinsäurelösung erfolgte unter der Annahme eines durchschnittlichen Molekulargewichts von 327 g/mol pro Nukleotid.

## 4.2 Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren

### 4.2.1 *Fill-In*-Reaktion zur Erzeugung einer dsDNA-Bibliothek

Den Ausgangspunkt für die Selektion von RNA-Aptameren stellte eine synthetische, einzelsträngige DNA-Bibliothek (ssDNA-Bibliothek) dar (Tab. 3.5), welche zunächst durch eine *Fill-In*-Reaktion in doppelsträngige DNA-Moleküle überführt wurde. Diese Reaktion erfolgte in zwei Teilschritten. Im ersten Schritt wurden zur ssDNA-Bibliothek komplementäre Oligonukleotide (RT-Primer) an das 3'-Ende der ssDNA hybridisiert (Tab. 4.4).

## 4 METHODEN

**Tab. 4.4: Hybridisierung der ssDNA-Bibliothek mit dem komplementären RT-Primer**

| Komponente                   | Volumen      | Finale Konzentration |
|------------------------------|--------------|----------------------|
| ssDNA-Pool [100 µM]          | 50 µl        | 5 µM                 |
| RT-Primer Pool R1 [100 µM]   | 200 µl       | 20 µM                |
| Hybridisierungspuffer (10 x) | 100 µl       | 1 x                  |
| Aqua dest.                   | Ad. 1.000 µl |                      |

Die Hybridisierungsansätze wurden 2 min bei 95 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt, um eine optimale Anlagerung komplementärer Oligonukleotide zu gewährleisten. Im zweiten Schritt wurde das Hybridisierungsprodukt unter Verwendung des Klenow-Fragments, der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, zu dsDNA vervollständigt (Tab. 4.5).

**Tab.4.5: Klenow-Reaktion zur Herstellung einer dsDNA-Bibliothek**

| Komponente                   | Volumen      | Finale Konzentration |
|------------------------------|--------------|----------------------|
| Hybridisierungsansatz (5 µM) | 500 µl       | (0,5 µM)             |
| Klenow-Puffer (10 x)         | 500 µl       | 1 x                  |
| dNTPs (25 mM)                | 100 µl       | 500 µM               |
| Klenow-Fragment (10 U/µl)    | 62,5 µl      | 0,125 U/µl           |
| Aqua dest.                   | Ad. 5.000 µl |                      |

Die Klenow-Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C und folgend die Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 75 °C. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels nativer PAGE (10%) kontrolliert. Die Ansätze wurden ohne weitere Reinigung einer T7-Transkription zur Herstellung der einzelsträngigen RNA-Bibliothek (ssRNA-Bibliothek) unterzogen (4.2.6).

### 4.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Herstellung und Amplifikation doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Mit Hilfe von zwei an die komplementären Stränge hybridisierenden Oligonukleotide (Primer) ermöglicht eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase die exponentielle Vermehrung eines gewünschten DNA-Templates. Ein typischer PCR-Ansatz unter Verwendung der FIREPol<sup>®</sup>, einer modifizierten Version der DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

## 4 METHODEN

**Tab. 4.6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes**

| Komponente                          | Volumen         | Finale Konzentration |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------|
| ss/dsDNA-Template                   | 1 - 10 $\mu$ l  | 0.1 - 10 nM          |
| 10x PCR-Reaktionspuffer B           | 10 $\mu$ l      | 1x                   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)           | 6,0 $\mu$ l     | 1,5 mM               |
| dNTP-Mix (25 mM)                    | 2,0 $\mu$ l     | 500 $\mu$ M          |
| RT-Primer (100 $\mu$ M)             | 1,0 $\mu$ l     | 1,0 $\mu$ M          |
| T7-Primer (100 $\mu$ M)             | 1,0 $\mu$ l     | 1,0 $\mu$ M          |
| FIREPol <sup>®</sup> (5 U/ $\mu$ l) | 1,0 $\mu$ l     | 0,05 U/ $\mu$ l      |
| Aqua dest.                          | Ad. 100 $\mu$ l |                      |

Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus drei Teilschritten: die Denaturierung doppelsträngiger DNA in die beiden Einzelstränge bei 95 °C, die Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei 50-60 °C und die Synthese des komplementären Stranges durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase bei 72 °C.

Zur Durchführung der PCR wurde folgendes Temperaturprogramm gewählt (Tabelle 4.7), das in Abhängigkeit der eingesetzten Primer bezüglich der *Annealing*-Temperatur bzw. in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Template bezüglich der Zyklenzahl variiert werden konnte.

**Tab.4.7: Temperaturprogramm zur Durchführung einer standardmäßigen PCR-Reaktion**

| Reaktionsschritt       | Temperatur    | Zeit     | Zyklenzahl |
|------------------------|---------------|----------|------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C         | 2 min    | 1          |
| Denaturierung          | 95 °C         | 30 s     | } 6 – 20   |
| Primeranlagerung       | 50 °C - 60 °C | 30 s     |            |
| Elongation             | 72 °C         | 30 s     |            |
| Finale Elongation      | 72 °C         | 5 min    | 1          |
|                        | 4 °C          | $\infty$ | 1          |

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Template. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurde eine native PAGE (10%iges PAA-Gel, 4.1.1) mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung (4.1.4) durchgeführt.

### 4.2.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Identifikation positiver rekombinanter Klone dar. Die zu analysierenden *E. coli*-Zellen wurden als Bakterienkolonie von der entsprechenden Agarplatte gepickt, deren Plasmid-DNA direkt als Template für eine PCR-Reaktion diente (4.2.3). Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte mittels nativer PAGE (10%iges PAA-Gel, 4.1.1).

### 4.2.4 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Umschrift und folgende Amplifikation von RNA zu dsDNA erfolgte mittels einer Reversen Transkription gekoppelt mit einer Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Im ersten Schritt, der RT-Reaktion, wurde die während der Aptamers Selektion (4.4) eluierte, gebundene RNA-Bibliothek unter Verwendung des Enzyms SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine spezielle Version der RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem Moloney Maus Leukämie-Virus mit reduzierter RNase H-Aktivität und erhöhter Thermostabilität.

In einem zweiten Schritt wurde die cDNA unter Verwendung der FIREPol<sup>®</sup> DNA-Polymerase zu dsDNA vervollständigt und mittels PCR amplifiziert. Ein RT-PCR-Ansatz enthielt die in Tabelle 4.8 aufgelisteten Komponenten.

**Tab. 4.8: RT-PCR-Ansatz zur Umschrift und Amplifikation eluierter RNA-Moleküle in dsDNA am Ende einer Selektionsrunde**

| Komponente                 | Volumen   | Finale Konzentration |
|----------------------------|-----------|----------------------|
| Eluierte RNA               | 50 µl     |                      |
| 10x PCR-Reaktionspuffer B  | 10 µl     | 1x                   |
| 5x cDNA Synthesepuffer     | 4,0 µl    | 0,2x                 |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)  | 6,0 µl    | 1,5 mM               |
| dNTP-Mix (25 mM)           | 1,2 µl    | 300 µM               |
| RT-Primer Pool R1 (100 µM) | 1,0 µl    | 1,0 µM               |
| T7-Primer Pool R1 (100 µM) | 1,0 µl    | 1,0 µM               |
| DTT (100 mM)               | 2,0 µl    | 2 mM                 |
| Aqua dest.                 | Ad. 98 µl |                      |

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert gefolgt von einer raschen Abkühlung auf Eis zur Hybridisierung des RT-Primers an die RNA. Nach Zugabe von 1,0 µl SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transkriptase (15 U/µl) und FIREPol<sup>®</sup> (5 U/µl) wurde die RT-PCR-Reaktion nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt (Tab. 4.9):

## 4 METHODEN

**Tab. 4.9: Temperaturprogramm zur Durchführung einer RT-PCR-Reaktion**

| Reaktionsschritt       | Temperatur | Zeit   | Zyklenzahl |
|------------------------|------------|--------|------------|
| Reverse Transkription  | 54 °C      | 10 min | 1          |
| Initiale Denaturierung | 95 °C      | 2 min  | 1          |
| Denaturierung          | 95 °C      | 30 s   | 4 – 20     |
| Primeranlagerung       | 60 °C      | 30 s   |            |
| Elongation             | 72 °C      | 30 s   |            |
| Finale Elongation      | 72 °C      | 5 min  | 1          |
|                        | 4 °C       | ∞      | 1          |

Der Erfolg der RT-PCR wurde mittels nativer PAGE (10%iges PAA-Gel, 4.1.1) analysiert.

### 4.2.5 Reinigung von PCR-Produkten mittels *PCR Purification Kit*

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte nach Herstellerangaben mittels des *PCR Purification Kits* “*NucleoSpin*<sup>®</sup> *Extract II*“ der Firma Machery-Nagel.

### 4.2.6 *In vitro* T7-Transkription zur Herstellung der RNA-Startbibliothek

Zur Herstellung einer RNA-Startbibliothek für die Selektion sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen verwendet. Als Template diente die in einer *Fill-In*-Reaktion hergestellte dsDNA-Bibliothek (4.2.1), deren Sequenz eine T7-Promoter-Region beinhaltet. Ein typischer Ansatz der *in vitro* T7-Transkription ist in Tabelle 4.10 gezeigt:

**Tab. 4.10: Reaktionsansatz zur Herstellung der RNA-Startbibliothek mittels *in vitro* T7-Transkription**

| Komponente  | Volumen    | Finale Konzentration |
|---|------------|----------------------|
| dsDNA-Bibliothek aus <i>Fill-in</i> -Reaktion (0,5 µM)  | 120 µl     | 0,1 µM               |
| 5x Transkriptionspuffer                                 | 60 µl      | 1x                   |
| MgCl <sub>2</sub> (100 mM)                              | 90 µl      | 15 mM                |
| NTP-Mix (25 mM)   | 60 µl      | 2,5 mM               |
| RiboLock <sup>TM</sup> Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) | 6,0 µl     | 0,4 U/µl             |
| T7-RNA-Polymerase (150 U/µl)                            | 1,0 µl     | 0,25 U/µl            |
| Aqua dest.  | Ad. 600 µl |                      |

## 4 METHODEN

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Der Reaktionsansatz wurde anschließend zum Abbau der dsDNA mit DNaseI (0,02 U/µl, 1 h, 37 °C) behandelt und zur Aufkonzentrierung einer Ethanolpräzipitation (4.1.9) unterzogen. Es folgte eine Reinigung der RNA-Bibliothek mittels präparativer, denaturierender PAGE (4.1.2).

### 4.2.7 *In vitro* T7-Transkription als Teil einer Selektionsrunde

Ab der zweiten Selektionsrunde erfolgte die Herstellung der RNA-Bibliothek ausgehend vom RT-PCR-Produkt (4.2.4) mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase. Ein typischer Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.11 gezeigt.

**Tab. 4.11: Reaktionsansatz einer *in vitro* T7-Transkription als Teil einer Selektionsrunde**

| Komponente                        | Volumen    | Finale Konzentration |
|-----------------------------------|------------|----------------------|
| dsDNA-Produkt aus RT-PCR (< 1 µM) | 10 µl      | < 0,1 µM             |
| 5x Transkriptionspuffer           | 20 µl      | 1x                   |
| MgCl <sub>2</sub> (100 mM)        | 15 µl      | 15 mM                |
| NTP-Mix (25 mM)                   | 10 µl      | 2,5 mM               |
| T7-RNA-Polymerase (150 U/µl)      | 1,0 µl     | 1,5 U/µl             |
| Aqua dest.                        | Ad. 100 µl |                      |

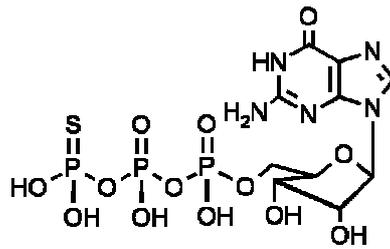
Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 15 – 30 min. Der Erfolg der T7-Transkription wurde mittels denaturierender PAGE (10% PAA; 4.1.2) kontrolliert. Die transkribierte RNA wurde ohne weitere Reinigung in die folgende Selektionsrunde eingesetzt.

### 4.2.8 T7-Transkription zur radioaktiven Markierung von RNA

Bindungsstudien wurden unter Verwendung radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Eine Möglichkeit dieser Markierung bietet der Einbau von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP während der T7-Transkription. Hierzu wurde dem Transkriptionsansatz (4.2.7)  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (0,1 µCi/µl; 100 nM) zugesetzt und die Konzentration des unmarkierten ATP von 2,5 mM auf 250 µM reduziert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Transkriptionsprodukte wurden anschließend mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert (4.1.9) und mittels präparativer, denaturierender PAGE (8% iges PAA-Gel; 4.1.2) gereinigt.

### 4.2.9 GTPS-T7-Transkription zur Fluoreszenzmarkierung von RNA

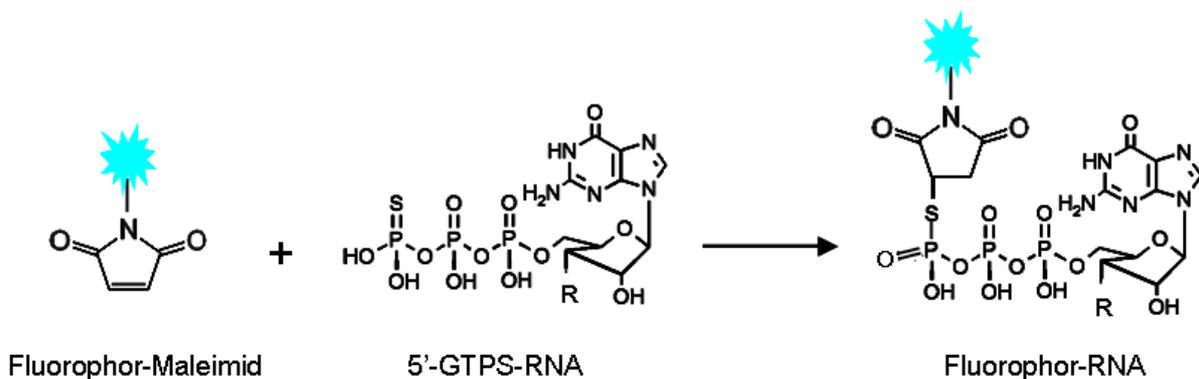
Zur Markierung von RNA mit Fluorophoren wurde eine *in vitro* T7-Transkription unter Einbau von Guanin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (GTPS, Abb. 4.1) durchgeführt.



**Abb. 4.1:** GTPS (Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) bzw. GTP- $\gamma$ -S). GTPS ist ein Analogon des GTP mit einem Molekulargewicht von 539,3 g/mol, wobei ein Sauerstoffatom am  $\gamma$ -ständigen Phosphatrest gegen ein Schwefelatom ausgetauscht wurde.

Dabei wurde GTP im Transkriptionsansatz (4.2.7) durch GTPS (2 mM) ersetzt. Die Transkription erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Transkriptionsprodukte wurden einer Ethanolpräzipitation (4.1.9) und Gelreinigung mittels denaturierender PAGE (10%iges PAA-Gel; 4.1.2) unterzogen.

Die gereinigte, am 5'-Ende GTPS-geprimte RNA wurde folgend einer Markierung mit den Verbindungen Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 C<sub>5</sub>-Maleimid bzw. Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 C<sub>2</sub>-Maleimid (3.7) unterzogen wobei die GTPS-RNA mit einem 500fachen molaren Überschuss des Fluorophor-Maleimids über Nacht bei RT reagierte (Abb. 4.2). Zur Abtrennung von nicht gebundenem Fluorophor wurde die markierte RNA einer Ethanolpräzipitation (4.1.9) und Gelreinigung (10%iges, denat. PAA-Gel; 4.1.2) unterzogen und final mittels denaturierender PAGE (4.1.2) kontrolliert.



**Abb. 4.2:** Kopplung eines Fluorophor-tragenden Maleimids an 5'-thiomodifizierte RNA. Die Thiolgruppe der 5'-GTPS-modifizierten RNA wird in einer Additionsreaktion mit dem Maleimid, welches einen fluoreszierenden Farbstoff (■) trägt, unter Ausbildung eines Thioethers verknüpft.

#### 4.2.10 Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA

Die Herstellung von am 5'-Ende radioaktiv markierter RNA verlief in zwei Teilschritten. Zunächst wurde die 5'-terminale Phosphoesterbindung spezifisch durch die alkalische Phosphatase CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) hydrolysiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 1 h. Ein Reaktionsansatz ist in Tab. 4.12 gezeigt.

## 4 METHODEN

**Tab. 4.12: Reaktionsansatz zur Dephosphorylierung von RNA am 5'-Ende mittels CIAP**

| Komponente                                       | Volumen        | Finale Konzentration |
|--|----------------|----------------------|
| RNA  |                | 2 $\mu$ M            |
| 10x CIAP-Puffer                                  | 5,0 $\mu$ l    | 1x                   |
| RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) | 1,25 $\mu$ l   | 1 U/ $\mu$ l         |
| CIAP (1 U/ $\mu$ l)                              | 3,0 $\mu$ l    | 0,06 U/ $\mu$ l      |
| Aqua dest.                                       | Ad. 50 $\mu$ l |                      |

Im Anschluss wurde die dephosphorylierte RNA mittels eines 10%igen, denaturierenden PAA-Gels gereinigt (4.1.2). Es folgte die 5'-terminale Phosphorylierung durch die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) mittels  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (Tab. 4.13).

**Tab. 4.13: Ansatz zur Kinasierung von RNA am 5'-Ende mittels T4-PNK**

| Komponente  | Volumen        | Finale Konzentration  |
|---|----------------|-----------------------|
| Dephosphorylierte RNA                                   |                | 1,0 $\mu$ M           |
| 10x PNK-Puffer A  | 2,0 $\mu$ l    | 1x                    |
| $\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) | 3,0 $\mu$ l    | 1,5 $\mu$ Ci/ $\mu$ l |
| T4-PNK (10 U/ $\mu$ l)                                  | 1,0 $\mu$ l    | 0,5 U/ $\mu$ l        |
| Aqua dest.  | Ad. 20 $\mu$ l |                       |

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h. Die RNA wurde einer Ethanolpräzipitation (4.1.9) und anschließender Reinigung mittels PAGE (10%iges, denat. PAA-Gel; 4.1.2) zur Abtrennung von nicht inkorporiertem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP unterzogen.

### 4.2.11 Radioaktive 3'-Endmarkierung von RNA

Die T4-RNA-Ligase katalysiert die Ligation des freien 5'-Phosphatendes einer Nukleinsäure (Donor) mit dem freien 3'-OH-Ende einer zweiten Nukleinsäure (Akzeptor). Diese ATP-abhängige Reaktion wurde genutzt, um RNA-Moleküle an ihrem 3'-OH-Ende mit [<sup>32</sup>P]-pCp zu ligieren und somit radioaktiv zu markieren.

Der Ansatz (Tab. 4.14) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und die markierte RNA einer Ethanolpräzipitation (4.1.9) mit anschließender Reinigung mittels denaturierender PAGE (10%iges PAA-Gel; 4.1.2) zur Abtrennung von freiem [<sup>32</sup>P]-pCp unterzogen.

## 4 METHODEN

**Tab. 4.14: Reaktionsansatz zur 3'-Endmarkierung von RNA mittels T4-RNA-Ligase**

| Komponente                         | Volumen   | Finale Konzentration |
|------------------------------------|-----------|----------------------|
| RNA                                |           | 5,0 µM               |
| 10x T4-RNA-Ligase-Puffer           | 2,0 µl    | 1x                   |
| [ <sup>32</sup> P]-pCp (10 µCi/µl) | 5,0 µl    | 2,5 µCi/µl           |
| T4-RNA-Ligase (12 U/µl)            | 1,0 µl    | 0,6 U/µl             |
| Aqua dest.                         | Ad. 20 µl |                      |

### 4.2.12 Spaltung von RNA mit Ribonuklease T1 (RNase T1)

RNase T1 spaltet einzelsträngige RNA (ssRNA) spezifisch nach Guanosen am 3'-Ende und wird häufig zur Sequenzanalyse von RNA eingesetzt. Aufgrund eines unvollständigen Abbaus von am 5'- oder 3'-Ende radioaktiv markierter RNA (\*RNA, 4.2.10, 4.2.11) durch RNase T1 entstehen unterschiedlich lange, nach Guanosen gespaltene Fragmente, wodurch Rückschlüsse auf die RNA-Sequenz ermöglicht werden. Zur Optimierung der RNA-Spaltung wurden 2 Reaktionsansätze (Tabelle 4.15) unterschiedlicher Konzentrationen an RNase T1 vorbereitet. Der verwendete Sequenzierungspuffer beinhaltete 7 M Harnstoff, um die Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen zu gewährleisten.

Die Reaktion wurde für 15 min bei RT durchgeführt. Nach Zugabe von 2x RNA-Ladepuffer wurden je 5 µl der Reaktionsansätze über ein 15%iges, denaturierendes PAA-Sequenziergel (4.1.2) ihrer Größe nach fraktioniert. Die restlichen Reaktionsansätze wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

**Tab. 4.15: Reaktionsansätze zur Spaltung von radioaktiv markierter RNA (\*) mit RNase T1**

| Komponente                  | Ansatz 1  |              | Ansatz 2  |              |
|-----------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
|                             | Volumen   | Finale Konz. | Volumen   | Finale Konz. |
| *RNA (1 µM)                 | 5,0 µl    | 0,25 µM      | 5,0 µl    | 0,25 µM      |
| tRNA (unmarkiert, 1 mg/ml)  | 2,5 µl    | 0,125 mg/ml  | 2,5 µl    | 0,125 mg/ml  |
| 1x RNA Sequenzierungspuffer | 10 µl     | 0,5 x        | 10 µl     | 0,5 x        |
| RNase T1 (10 U/µl)          | 1,0 µl    | 0,5 U/µl     | 0,1 µl    | 0,05 U/µl    |
| Aqua dest.                  | Ad. 20 µl |              | Ad. 20 µl |              |

### 4.2.13 Partielle alkalische Hydrolyse von Ribonukleinsäuren

Durch alkalische Hydrolyse erfolgt der Abbau von RNA-Molekülen unspezifisch nach jedem Nukleotid. Diese Methode wird häufig zur Herstellung von RNA-Leitern genutzt, die als Größenstandard während der Sequenzanalyse von RNA dienen. Zur Optimierung der hydrolytischen Spaltung von am 5'- oder 3'-Ende radioaktiv markierter RNA (\*RNA, 4.2.10, 4.2.11) wurden die Reaktionsansätze (Tabelle 4.16) unterschiedlichen Inkubationszeiten (2 min, 5 min und 15 min) bei 95 °C unterzogen.

**Tab. 4.16: Reaktionsansatz zur hydrolytischen Spaltung von radioaktiv markierter RNA (\*)**

| Komponente                     | Volumen   | Finale Konzentration |
|--------------------------------|-----------|----------------------|
| *RNA (1 µM)                    | 5,0 µl    | 0,25 µM              |
| tRNA (unmarkiert, 1 mg/ml)     | 2,5 µl    | 0,125 mg/ml          |
| 2x alkalischer Hydrolysepuffer | 10 µl     | 1 x                  |
| Aqua dest.                     | Ad. 20 µl |                      |

Nach der Reaktion erfolgte die Zugabe von 2x RNA-Ladepuffer. Je 5 µl der Reaktionsansätze wurden über ein 15%iges PAA-Sequenziergel (4.1.2) ihrer Größe nach fraktioniert. Die Reste der Reaktionsansätze wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

## 4.3 Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse

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

Die Analyse von Proteinen mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-PAGE erfolgte nach dem Prinzip von Laemmli [75]. Mit diesem Verfahren können Proteine ihren Molekulargewichten entsprechend voneinander getrennt werden. Die Gele setzten sich aus einem fokussierenden Sammelgel und einem separierenden Trenngel zusammen (Tab. 4.17 und 4.18).

**Tab. 4.17: Zusammensetzung der Sammelgele denaturierender SDS-PAA-Gele**

| Komponente                          | 4%ige PAA-Gele |
|-------------------------------------|----------------|
| Sammelgelpuffer (4x)                | 1x             |
| Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v) | 4%             |
| TEMED (v/v)                         | 0,07%          |
| APS (w/v)                           | 0,07%          |

## 4 METHODEN

**Tab. 4.18: Zusammensetzung der Trenngele denaturierender SDS-PAA-Gele**

| Komponente                          | 12,5%ige PAA-Gele | 15%ige PAA-Gele |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| Trenngelpuffer (4x)                 | 1x                | 1x              |
| Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v) | 12,5%             | 15%             |
| TEMED (v/v)                         | 0,07%             | 0,07%           |
| APS (w/v)                           | 0,07%             | 0,07%           |

Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem stark negativ geladenen Detergenz, erhalten alle Proteine eine einheitlich negative Ladung, sodass eine Trennung lediglich auf der Molekülgröße beruht. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2x SDS-Proteinladepuffer versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 170 V.

### 4.3.2 Anfärben von Proteinen mit *Coomassie Brilliant Blue*

Zur Färbung von Proteinbanden nach der Trennung mittels SDS-PAGE (4.3.1) wurde das Gel für 2 h in *Coomassie*-Färbelösung geschwenkt und anschließend in 10%iger Essigsäure bis zum gewünschten Grad entfärbt.

### 4.3.3 Biotinylierung von Proteinen

Zur Selektion sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere unter Verwendung magnetischer Partikel wurden die Zielmoleküle biotinyliert und auf der Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten Dynabeads<sup>®</sup> immobilisiert. Das Sulfo-NHS-LC-Biotin (3.8) ermöglicht eine einfache und effiziente Markierung von Antikörpern, Proteinen und anderen Molekülen, die primäre Aminogruppen tragen. Zur Biotinylierung des sIL-6R wurde das Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz als wässrige Lösung frisch hergestellt (10 mM; M = 556,59 g/mol). Der sIL-6R wurde mit einem dreifach molaren Überschuss an Biotinylierungsreagenz (3.8) versetzt, für 15 min auf Eis und weitere 15 min bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde mittels Dialyse (4.3.4) abgetrennt und die Biotinylierung mittels Dot Blot (4.3.5) unter Verwendung von ExtrAvidin<sup>®</sup>-Alkaliner Phosphatase kontrolliert. Um eventuelle Proteindegradationen auszuschließen, wurde eine SDS-PAGE (7,5 – 15%ig) durchgeführt (4.3.1).

### 4.3.4 Dialyse

Die Dialyse des sIL-6R erfolgte in einer *Slide-A-Lyzer*<sup>®</sup> Dialysekassette (MWCO = 10.000; 3.8) über Nacht bei 4 °C gegen 1x Selektionspuffers A.

### 4.3.5 Dot Blot

Der Nachweis einer Proteinbiotinylierung erfolgte mittels Dot Blot. Dazu wurden definierte Mengen an biotinyliertem sIL-6R auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Als Negativkontrolle diente eine Probe an nicht modifiziertem sIL-6R. Nach Trocknen wurde die Membran in 25 ml Blockpuffer überführt und 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal in 25 ml 1x PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 25 ml AK-Puffer mit 10 µl ExtrAvidin<sup>®</sup> Alkaline Phosphatase (3.3) und eine Inkubation von 1 h bei RT. Folgend wurde die Membran zweimal mit 25 ml 1x PBS und einmal in 25 ml Reaktionspuffer jeweils für 5 min gewaschen. Die Zugabe von 12,5 ml AP-Substratlösung (NBT-BCIP) leitete die Farbreaktion ein. Die Reaktion wurde durch Überführen der Membran in Wasser beendet.

### 4.3.6 Kopplung biotinylierter Proteine an Dynabeads<sup>®</sup>

Der biotinylierte sIL-6R wurde auf der Oberfläche von Dynabeads<sup>®</sup> M-280 immobilisiert. Dabei handelt es sich um paramagnetische Polystyrenkügelchen ( $6-7 \times 10^8$  Partikel; 10 mg/ml), auf deren hydrophoben Oberflächen kovalent Streptavidin gebunden ist. Durch die Interaktion des Biotins mit Streptavidin kommt es zur Immobilisierung des biotinylierten sIL-6R auf der Oberfläche dieser magnetischen Partikel.

Zur Kopplungsreaktion wurden 500 µl Dynabeads<sup>®</sup> fünfmal mit 500 µl 1x Kopplungspuffer A gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Dynabeads<sup>®</sup> während der gesamten Waschschriffe nicht austrockneten. Die Dynabeads<sup>®</sup> wurden in 1 ml 1x Kopplungspuffer A resuspendiert, 100 µg biotinylierter sIL-6R zugegeben und 15 min bei 4 °C invertiert. Es schlossen sich fünf Waschschriffe mit je 500 µl 1x Kopplungspuffer A und zwei Waschschriffe mit je 500 µl 1x Kopplungspuffer B an. Die sIL-6R-Beads wurden in 1.500 µl 1x Kopplungspuffer B resuspendiert und konnten direkt zur Aptamerelektion eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

## 4.4 *In Vitro* Selektion von RNA-Aptameren mittels magnetischer Beads

Für die Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für den löslichen IL-6-Rezeptor wurde in der ersten Selektionsrunde eine definierte Menge der RNA-Ausgangsbibliothek R1 (500 pmol) direkt mit dem an Dynabeads<sup>®</sup>-immobilisierten (4.3.6) sIL-6R (100 pmol) in 1x Selektionspuffer B für 30 min bei RT inkubiert. Die an das Target bindenden RNA-Moleküle wurden mittels magnetischer Separation von nicht bindenden Molekülen abgetrennt, der Überstand verworfen und die RNA-Target-Komplexe einmal mit 100 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen. Die Elution bindender Nukleinsäuren erfolgte nach vorsichtigem

## 4 METHODEN

Resuspendieren in 55 µl aqua dest. unter Hitzeeinwirkung bei 80 °C für 3 min. Dieses Eluat wurde direkt ohne weitere Reinigungsschritte einer RT-PCR (4.2.4) unterzogen. Der Erfolg der RT-PCR wurde mittels PAGE (10%iges, natives PAA-Gel, 4.1.1) kontrolliert.

Ab der zweiten Selektionsrunde wurde das RT-PCR-Produkt direkt einer *in vitro* T7-Transkription unterzogen (4.2.7). Ohne weitere Reinigung wurden 20 µl des Transkriptionsansatzes mit dem an Dynabeads<sup>®</sup> immobilisierten sIL-6R inkubiert. Nach Abtrennung nicht-bindender RNA-Moleküle wurden die Beads zweimal mit 100 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen, wobei sich mit steigender Selektionsrunde die Anzahl der Waschschriffe erhöhte. Eine detaillierte Übersicht ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (Tab. 5.1).

### 4.5 Klonierungsmethoden

#### 4.5.1 TOPO TA Cloning<sup>®</sup>

Das TOPO TA Cloning<sup>®</sup> dient der effizienten Klonierung von PCR-Produkten. Die dazu verwendete Taq-DNA-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, wodurch ein Desoxyadenosinmonophosphat an das 3'-Ende der DNA angefügt wird. Der linearisierte Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen) besitzt an seinen 3'-Enden einzelne überhängende Desoxythymidinreste, die kovalent mit der DNA-Topoisomerase I des Vaccinia Virus verknüpft sind und eine Ligation des Vektors mit den PCR-Produkten ermöglichen. Die Klonierungsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.5.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen für eine Transformation mittels Elektroporation erfolgte nach Dower *et al.* [76]. Es wurde eine Vorkultur von *E. coli* TOP10-Zellen in LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag konnte die Vorkultur zum Animpfen einer 400 ml Hauptkultur genutzt werden, welche man bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultivierte, so dass die Kultur die logarithmische Wachstumsphase erreichte. Die Kultur wurde rasch im Eisbad abgekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C. Nach dem Aliquotieren auf sterile 50 ml-Reaktionsgefäße folgte eine Zentrifugation bei 3.000 g und 4 °C für 15 min. Die Zellen wurden zweimal mit 50 ml und zweimal mit 25 ml eiskaltem aqua dest. gewaschen, vereinigt und nochmals bei 3.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, die Zellen zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 4.5.3 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden 50 µl kompetente *E. coli* TOP10-Zellen (4.5.2) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 µl des jeweiligen Klonierungsansatzes (4.5.1) wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und mittels Elektroporation bei 1,8 kV transformiert. Durch Zugabe von 450 µl vorgewärmtem SOC-Medium konnten die Zellen vorsichtig aus der Küvette herausgespült und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Regeneration und Resistenzausbildung wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. 25 – 150 µl der Zellsuspension wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ausplattiert, welche lediglich mit 5 µl aqua dest. transformiert worden waren.

### 4.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* TOP10-Zellen erfolgte mit Hilfe des *Hi Yield Plasmid Mini-DNA*-Kits der Firma Süd-Laborbedarf nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA-Lösung konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 4.5.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels der *BigDye Terminator Cycle* Methode, einer Kombination der Kettenabbruchmethode nach Sanger [77] und der *Thermal Cycling* Methode nach Murray [78] unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTP). In Tab. 4.19 ist ein Ansatz zur Sequenzierung gezeigt.

**Tab. 4.19: Ansatz zur Sequenzierung von Plasmid-DNA nach der *BigDye Terminator Cycle* Methode**

| Komponente                      | Volumen   | Finale Konzentration nach Zugabe des <i>BigDye Terminator Mix</i> |
|---------------------------------|-----------|---|
| Plasmid-DNA                     |           | 25 ng/µl  |
| DNA-Sequenzierungspuffer (5x)   | 4 µl      | 1x  |
| M13 reverse Primer (10 pmol/µl) | 1,0 µl    | 0,5 pmol/µl   |
| aqua dest.                      | Ad. 18 µl |   |

Nach einer initialen Denaturierung der Proben für 5 min bei 96 °C schloss sich die Zugabe von 2 µl *Big-Dye Terminator Mix* an. Die Reaktion folgte dem in Tabelle 4.20 dargestellten Verlauf.

## 4 METHODEN

**Tab. 4.20: Temperaturprofil einer Sequenzierungsreaktion nach der *BigDye Terminator Cycle Methode***

| Reaktionsschritt | Temperatur | Zeit  | Zyklenzahl |
|------------------|------------|-------|------------|
| Denaturierung    | 96 °C      | 30 s  | 25         |
| Primeranlagerung | 48 °C      | 15 s  |            |
| Elongation       | 60 °C      | 4 min |            |
|                  | 4 °C       | ∞     | 1          |

Der Sequenzierungsansatz wurde einer Ethanol-fällung (4.1.9) unterzogen. Der Sequenzierlauf wurde am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE, Hamburg) durchgeführt. Die Auswertung erhaltener Sequenzen erfolgten unter Verwendung der Software Chromas Lite 2.01 und Vector NTI Advance™.

### 4.6 Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktionen

#### 4.6.1 Analytische Filterbindungsstudien

Die Untersuchung von Aptamer-Protein-Interaktionen und die Bestimmung von Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) erfolgten mittels Filterbindungsstudien. Dazu wurde eine konstante Menge ( $< 1$  nM) an radioaktiv markierter RNA (4.2.8) mit steigenden Konzentrationen (1 nM – 300 nM) an Protein für 20 min bei RT inkubiert. Als Puffer diente dabei, soweit nicht anders erwähnt, der 1x Selektionspuffer B. Eine Nitrozellulosemembran wurde 10 min mit Amino-hexansäure-Puffer (Tab. 3.1) vorbehandelt, in eine 96-well-Dot Blot-Apparatur (Schleicher&Schüll) eingespannt und nach unter Vakuum zweimal mit 200  $\mu$ l 1x Selektionspuffer B gewaschen.

Die Reaktionsansätze wurden über die Nitrozellulosemembran filtriert. An das Protein bindende RNA-Moleküle wurden auf der Membran zurück gehalten. Nicht-bindende RNA-Moleküle wurden durch viermaliges Waschen mit 1x Selektionspuffer B entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde getrocknet und die auf der Membran verbliebenen Mengen an radioaktiv markierten Substanzen mit Hilfe des Phosphorimagers (4.1.5) quantifiziert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte unter Verwendung der Software Quantity One®. Zur graphischen Darstellung von Bindungskurven wurde das Programm GraphPad Prism® genutzt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) erfolgte nach einem *One-Site-Binding-Model* auf Grundlage der folgenden Gleichung, wobei  $B_{max}$  den maximal möglichen Anteil gebundener RNA darstellt.

$$RNA_{\text{gebunden}} = \frac{B_{\text{max}} * C_{\text{Protein}}}{K_d + C_{\text{Protein}}}$$

#### 4.6.2 Analyse von Aptamer-Protein-Interaktionen mittels nativer PAGE

Der Nachweis von Aptamer-Protein-Interaktionen erfolgte mittels 5%iger, nativer PAGE. Unter nativen Bedingungen gebildete Aptamer-Protein-Komplexe weisen aufgrund ihrer Größe ein verzögertes Migrationsverhalten im Gel auf. Die Komplexe wandern daher langsamer als die entsprechenden freien RNA-Moleküle und werden als sogenannter „Shift“ im Gel detektierbar.

Für die Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurden gleiche Mengen (~ 1 nM) radioaktiv markierter RNA (4.2.8) mit steigenden Proteinmengen (1 nM – 300 nM) in 1x Selektionspuffer B für 30 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer (Tab. 3.1) versetzt und mittels nativer PAGE (5%iges PAA-Gel) analysiert. Die Zusammensetzung dieser Polyacrylamidgele ist in Tabelle 4.21 dargestellt.

**Tab. 4.21: Zusammensetzung 5%iger, nativer Polyacrylamidgele (Größe: 130 x 80 x 0,75 mm)**

| Komponente                          | 5%ige PAA-Gele |
|-------------------------------------|----------------|
| TBE                                 | 1x             |
| Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v) | 5%             |
| TEMED (v/v)                         | 0,1%           |
| APS (w/v)                           | 0,1%           |

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 80 V und 4 °C in 1x TBE. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel unter Anlegen von Vakuum getrocknet. Die radioaktiven Banden wurden mittels Autoradiographie detektiert (4.1.5).

#### 4.6.3 „Damage Selection“: Minimalmotivsuche sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere

Für die Minimalmotivsuche selektierter RNA-Aptamere mit Affinität für den sIL-6R wurden die jeweiligen RNAs am 5'- bzw. 3'-Ende radioaktiv markiert (4.2.10, 4.2.11). Durch alkalische Hydrolyse konnten Spaltprodukte jeder möglichen Länge erzeugt werden (4.2.13). Diese Spaltprodukte in 1x Selektionspuffer B aufgenommen (20 µl Endvolumen) und analog zur Aptamerselektion mit 80 µl des an Dynabeads®-immobilisierten sIL-6R (100 pmol, 4.3.6) in 1x Selektionspuffer B für 30 min bei RT inkubiert. Fragmente, die nicht an das Target binden konnten, wurden mittels magnetischer Separation abgetrennt. Die RNA-Target-

## 4 METHODEN

Komplexe wurden einmal mit 100 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen und bindende Fragmente in 10 µl Harnstoff (10 M) unter Hitzeeinwirkung bei 80 °C für 3 min eluiert. Das Eluat wurde direkt über ein 15%iges PAA-Sequenziergel (4.1.3) analysiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Aptamer-RNA in weiteren Ansätzen sowohl einer alkalischen Hydrolyse (4.2.13) als auch einer RNase T1-Spaltung unterzogen (4.2.12) und zur Identifikation der Bandengrößen ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

### 4.6.4 Sekundärstrukturanalyse selektierter RNA-Aptamere

Die Sekundärstrukturanalysen der erhaltenen Aptamersequenzen wurden mit Hilfe des Programms *mfold web server* (Version 3.2) von Zuker und Turner durchgeführt und die erhaltenen Strukturen gegebenenfalls untereinander verglichen.

### 4.6.5 Verkürzung von RNA-Aptameren anhand vorausgesagter Sekundärstrukturen

Basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen unter Anwendung des Programms *mfold web server* (Version 3.2) wurde die Sequenz des Aptamers 16-3 verkürzt. Zunächst wurden die Primerbereiche der ursprünglichen Sequenz entfernt. Weiterhin wurde das Aptamer empirisch verkürzt, wobei die G-reiche Konsensussequenz stets erhalten blieb. Zusätzlich wurden Mutationen eingefügt, die die Stabilität der Aptamere beeinflussen sollten.

Um die zu testenden RNAs *in vitro* transkribieren zu können, wurden die DNA-Einzelstränge (*forward*- und *reverse*-Strang, Tab. 3.5) käuflich erworben (Invitrogen), einer Hybridisierung bzw. PCR mit den entsprechenden Primer-Paaren (Tab. 3.5) und anschließenden T7-Transkription unterzogen (4.2.7).

## 4.7 Zellbiologische Arbeiten

Alle zellbiologischen Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Medien oder Puffer wurden ebenfalls in steriler Form verwendet.

### 4.7.1 Stammhaltung und Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die murinen Prä-B-Zelllinien BAF/3, welche mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. mit den cDNAs für gp130, IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL-6R/TNF) stabil transfiziert waren, wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert und im Brutschrank bei 37 °C gehalten. Als Kulturmedium diente DMEM versetzt mit FKS (10 %) und 1x PenStrep (Tab. 3.4). Den BAF/gp130-Zellen wurde zusätzlich Hyper-IL-6 (10 ng/ml) zugesetzt, den BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen zusätzlich das Zytokin IL-6 (10 ng/ml) und das Antibiotikum Puromycin

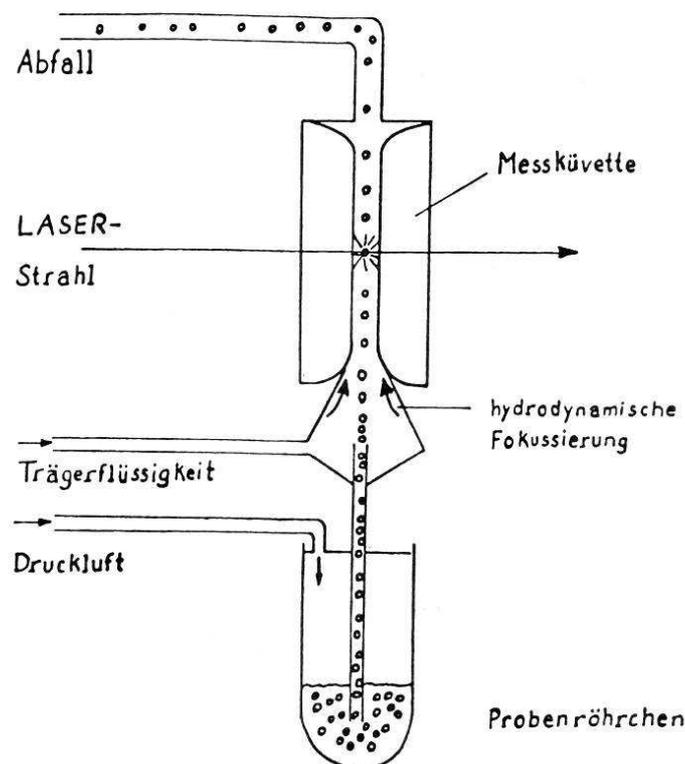
## 4 METHODEN

(12 µg/ml). Als Kontrolle wurde das Wachstum der Zellen auch in Abwesenheit der Zytokine beobachtet, da ohne diese Stimuli ein Zellwachstum nicht möglich war.

Zur Stammhaltung der Suspensionszellen war es notwendig, diese regelmäßig zu passagieren. Bei Erreichen einer gewünschten Kulturdichte wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g, 5 min) und in frischem Medium durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. In neuen 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen legte man 5 ml frisches Kulturmedium vor und tropfte notwendige Mengen an Zellsuspension hinzu. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

### 4.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein analytisches Verfahren, welches eine simultane Erfassung mehrerer physikalischer Eigenschaften von Einzelzellen ermöglicht. Man erhält Informationen über die relative Zellgröße, die relative Granularität und Fluoreszenzintensität. Zur Analyse fluoreszierender Zellen wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen überführt und durch hydrodynamische Fokussierung entlang einer Kapillare in die Messküvette geleitet (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Prinzip der Durchflusszytometrie [79].** Fluoreszierende Zellen werden hydrodynamisch entlang einer Kapillare in eine Messküvette geleitet. In der Messküvette werden die Zellen bzw. die Fluorophore durch einen fokussierten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge angeregt. Die Abgabe der Energie erfolgt über Fluoreszenzemission.

## 4 METHODEN

Bei Eintritt in die Messküvette werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt. Am Analysepunkt trifft ein fokussierter Laserstrahl geeigneter Wellenlänge auf die durchströmende Zelle. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes werden dessen Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Abgabe von Energie fallen die Elektronen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Das emittierte Fluoreszenzsignal wird von einem Photodetektor registriert und ist proportional zur Menge an pro Zelle gebundenem Fluorophor. Zusätzlich erhält man über die Messung des seitwärts entstehenden Streulichts (*side scatter*; SSC) Informationen über die Zellgröße. Auskünfte über die Zellgranulärität gibt das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC).

Die Analysen mittels Durchflusszytometrie erfolgten am FACScan der Firma Becton Dickinson. Vor der eigentlichen Messung wurde das Probenröhrchen mit den zu vermessenen Zellen in den Probenhalter des Gerätes eingespannt und bei niedriger Durchflussgeschwindigkeit eine Probemessung gestartet. Die Zellen wurden zunächst auf ihre Größe (FSC) bzw. unterschiedlichen Granularitäten (SSC) analysiert. Zeigte sich eine einheitliche Zellpopulation, wurde folgend der passende Emmissionsdetektor ausgewählt, mit dem die Fluoreszenz der Zellen detektiert werden konnte. Aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen der Anregungslaser (Argon-Laser: 488 nm, Helium-Neon-Laser: 633 nm) konnten Fluorophore mit unterschiedlichen Emmissionsspektren genutzt werden (Tab. 4.22).

**Tab. 4.22: Auflistung der am Durchflusszytometer vermessenen Fluorophore, Anregungswellenlängen der Laser und Detektoren.**

| Fluorophor                  | Detektor | Anregungswellenlänge des Lasers |
|-----------------------------|----------|---------------------------------|
| AlexaFluor <sup>®</sup> 488 | FL-1     | 488 nm                          |
| AlexaFluor <sup>®</sup> 647 | FL-4     | 633 nm                          |
| FITC                        | FL-1     | 488 nm                          |

Die Ergebnisse wurden jeweils durch Auftragung der vermessenen Zellzahl (Ordinate) gegen die entsprechende Fluoreszenzintensität (Abszisse) dargestellt.

### 4.8.1 Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen

Zum Nachweis des Interleukin-6-Rezeptors auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie unter Einsatz eines IL-6R-spezifischen Antikörpers (3.10) angewandt. Zur Vorbereitung wurden sowohl BAF/gp130-Zellen als auch BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (analog 4.7.1) kultiviert. Zur Ernte wurden die Zellen für 5 min bei 500 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml DMEM (ohne FKS) aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer

## 4 METHODEN

Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden je 500.000 IL-6R-tragende BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen bzw. zur Kontrolle BAF/gp130-Zellen einmal mit 500 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen, in 250 µl des gleichen Puffers resuspendiert und mit einem hIL-6R-spezifischen murinen Antikörper (2 µg/ml) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min abgetrennt. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen. Nach Resuspension in 250 µl Puffer folgte die Zugabe des sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK (3.10) und eine Inkubation für 30 min bei 4 °C. Nach Entfernen des überschüssigen AK wurden die Zellen in geeignete Messröhrchen pipettiert und die Antikörperbindung am Durchflusszytometer durch Messung von jeweils 10.000 Zellen analysiert.

### **4.8.2 Analyse der Aptamerbindung an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen**

Die Analyse der Aptamer-Bindung an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. 500.000 BAF/gp130-Zellen bzw. IL-6R-tragende BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen wurden zweimal mit 500 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen, in 350 µl des gleichen Puffers resuspendiert und mit 8 – 10 pmol der zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten RNA (4.2.9) für 5 min bei RT inkubiert. Zur Abtrennung ungebundener RNA-Moleküle folgte eine Zentrifugation der Zellen bei 500 g für 5 min. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 1x Selektionspuffer B gewaschen. Nach Resuspension in 350 µl 1x Selektionspuffer B wurde die Aptamerbindung am Durchflusszytometer durch Messung von jeweils 10.000 Zellen analysiert.

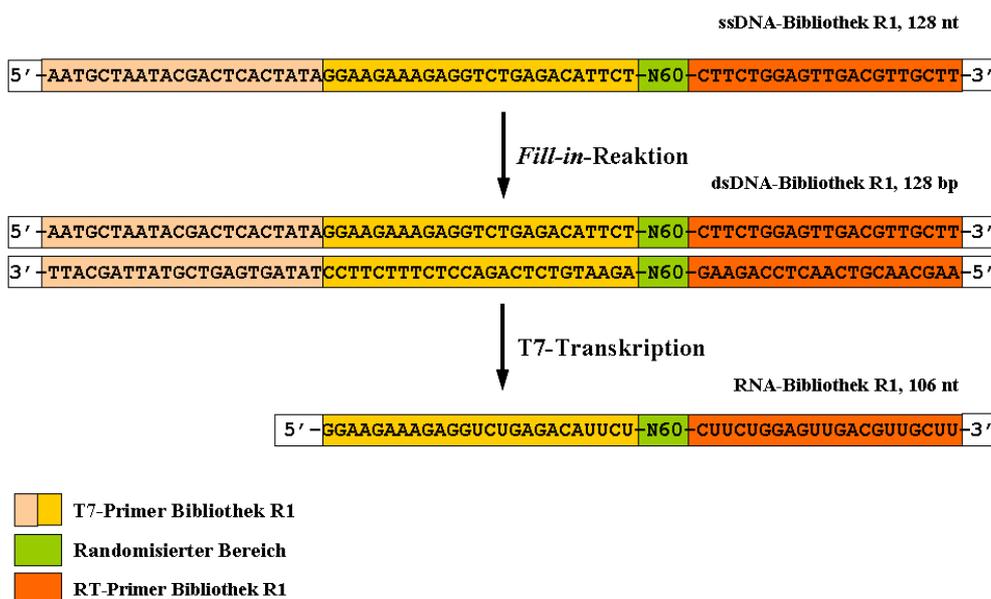
## 5 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit lag in der Selektion von RNA-Aptameren, die spezifisch den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) binden. Der wahrscheinlich kritischste Schritt während eines solchen Selektionsverfahrens liegt in der Trennung Protein-bindender von nicht-bindenden Nukleinsäuren [51]. Die Wahl der Separationsmethode fiel dabei auf die Anwendung magnetischer Partikel (Dynabeads®) als stationäre Phase. Dazu wurde der sIL-6R, bei welchem es sich um die lösliche Variante des IL-6R handelt, biotinyliert und folgend über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion auf der Oberfläche Streptavidin-gekoppelter Dynabeads® immobilisiert. Diese Protein-gekoppelten Partikel konnten für die Aptamerselektion eingesetzt werden. Eine weitere Voraussetzung für den Erfolg der Selektion, d. h. der Anreicherung von RNA-Molekülen mit den gewünschten Eigenschaften, war die Herstellung einer RNA-Startbibliothek genügend hoher Sequenzvielfalt.

### 5.1 Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für den sIL-6R

#### 5.1.1 Herstellung der RNA-Startbibliothek R1

Für die Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für den sIL-6R war es notwendig, eine RNA-Bibliothek hoher Diversität zu erzeugen. Die käuflich erworbene, synthetisch hergestellte ssDNA-Bibliothek R1 diente als Grundlage (Abb. 5.1, Tab. 3.5).

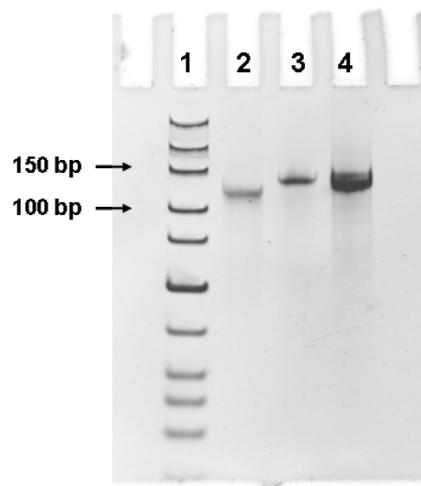


**Abb. 5.1: Herstellung der RNA-Startbibliothek R1 für die Selektion von RNA-Aptameren mit Affinität für sIL-6R.** Ausgehend von einer synthetisch hergestellten ssDNA-Bibliothek wurde mittels *Fill-in-Reaktion* eine Bibliothek an dsDNA-Molekülen einer Länge von 128 bp erzeugt. Diese dsDNA wies neben einer randomisierten Region von 60 Nukleotiden (■) zwei flankierende, konstante Regionen zur Hybridisierung des T7-Primers R1 (■) bzw. des RT-Primers R1 (■) auf. Die T7-Primer-Region beinhaltete die Sequenz des T7-Promotors (●), welcher als Erkennungssequenz der T7-RNA-Polymerase fungiert und eine Transkription der dsDNA in die RNA-Startbibliothek (106 nt) ermöglichte.

## 5 ERGEBNISSE

Die Sequenz der ssDNA-Bibliothek R1 war charakterisiert durch einen randomisierten Bereich von 60 Nukleotiden, welcher sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende von konstanten Regionen flankiert war. Diese dienten der Anlagerung zweier komplementärer Oligonukleotide: der T7-Primer-R1 und der RT-Primer-R1 (3.9, Tab. 3.5). Nach jedem Selektionszyklus wurden die eluierten RNA-Moleküle nach Anlagerung des RT-Primers-R1 mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und in einer sich anschließenden PCR zu dsDNA aufgefüllt und amplifiziert.

Zur Vorbereitung des ersten Selektionszyklus wurde die ssDNA-Bibliothek R1 einer *Fill-in*-Reaktion (4.2.1) unterzogen und mittels PAGE analysiert (Abb. 5.2). Die ssDNA-Moleküle der Bibliothek waren 128 nt lang (Abb. 5.2, Spur 2). Bereits nach Hybridisierung des RT-Primers-R1 an die ssDNA konnte ein verlangsamtes Laufverhalten beobachtet werden (Abb. 5.2, Spur 3). Durch Auffüllen des Hybridisierungsproduktes mit Hilfe des Klenow-Fragments wurde doppelsträngige DNA einer Länge von 128 bp erzeugt (Abb. 5.2, Spur 4).

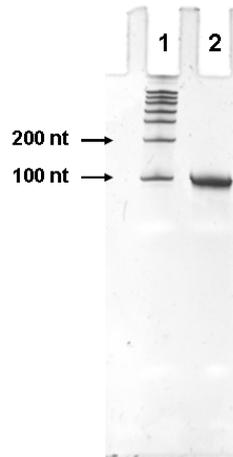


**Abb. 5.2: Kontrolle der *Fill-in*-Reaktion zur Herstellung der dsDNA-Bibliothek R1 mittels analytischer nativer PAGE (10%iges PAA-Gel).** Die chemisch synthetisierte ssDNA-Bibliothek R1 (128 nt) wurde mittels *Fill-in*-Reaktion in eine dsDNA-Bibliothek überführt. Diese Reaktion setzte sich aus zwei Teilschritten zusammen. Im ersten Schritt wurde ein zur ssDNA-Bibliothek komplementäres Oligonukleotid (RT-Primer-R1) an deren 3'-Ende hybridisiert. Folgend wurde der Zweitstrang unter Verwendung des Klenow-Fragmentes synthetisiert. Die Detektion der Nucleinsäuren im Gel erfolgte unter UV-Licht nach Färbung mit EtBr (4.1.4). Spur 1: *Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 2: ssDNA-Bibliothek R1 (3 pmol); Spur 3: Hybridisierungsprodukt (1,5 pmol); Spur 4: dsDNA-Bibliothek R1 nach Klenow-Reaktion (3 pmol).

Die Komplexität der hergestellten DNA-Bibliothek R1 beinhaltet in etwa  $1,5 \times 10^{15}$  verschiedene Moleküle. Ein Teil dieser Bibliothek ( $\sim 3,6 \times 10^{13}$  Moleküle) wurde einer *in vitro* T7-Transkription zur Herstellung der RNA-Ausgangsbibliothek R1 unterzogen. Nach DNase I-Spaltung (4.2.6) und Gelreinigung (4.1.3; 4.1.8) wurde der RNA-Pool mittels eines 10%igen denaturierenden PAA-Gels (4.1.3) analysiert. Es zeigte sich eine RNA-Bande mit

## 5 ERGEBNISSE

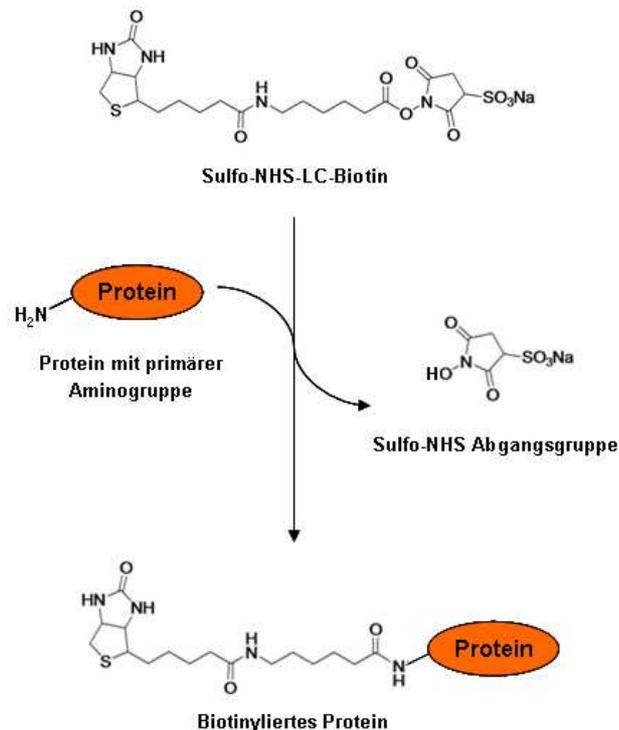
einer Länge von 106 nt (Abb. 5.3, Spur 2). Die RNA-Bibliothek stand folgend für die erste Selektionsrunde zur Anreicherung sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere zur Verfügung.



**Abb. 5.3:** Analytisches, denaturierendes PAA-Gel (10%ig) der *in vitro* transkribierten und gereinigten RNA-Bibliothek R1. Spur 1: Low Range RNA Ladder; Spur 2: 10 pmol RNA-Bibliothek R1 (106 nt). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht nach Färbung mit EtBr (4.1.4).

### 5.1.2 Biotinylierung des sIL-6R und Kopplung an Dynabeads®

Neben der Herstellung der RNA-Ausgangsbibliothek lag eine zweite Voraussetzung für die Selektion der IL-6R-spezifischen RNA-Aptamere in der Immobilisierung des Zielproteins auf der Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten magnetischen Partikeln (Dynabeads®).



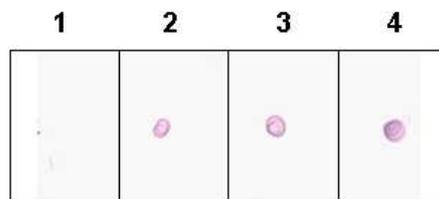
**Abb. 5.4:** Biotinylierung von Proteinen unter Verwendung des Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenzes. Peptide oder Proteine können an primären Aminogruppen (N-Terminus, Lysinreste) unter Ausbildung stabiler Amidbindungen biotinyliert werden [80].

## 5 ERGEBNISSE

Das Zielmolekül dieser Arbeit ist der humane, lösliche IL-6R (sIL-6R; ~ 50 kDa; 339 AS), d. h. der IL-6R ohne Transmembran- und zytoplasmatische Domäne. Da die Ligandenbindung an den IL-6R über die extrazellulären Domänen vermittelt wird, konnte diese lösliche Variante zur Selektion IL-6R-spezifischer RNA-Aptamere eingesetzt werden.

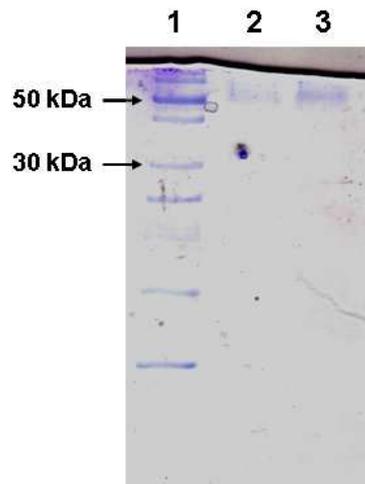
Das Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz ermöglicht eine effiziente Markierung von Proteinen an primären Aminogruppen, d. h. an deren N-Terminus und an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinseitenketten (Abb. 5.4). Das Reagenz wurde frisch als wässrige Lösung hergestellt und in einem dreifach molaren Überschuss mit dem sIL-6R inkubiert (4.3.3). Nach Abtrennung des überschüssigen Reagenzes mittels Dialyse (4.3.4) wurde der Erfolg der Biotinylierung mittels Dot Blot (4.3.5) kontrolliert.

Der Nachweis mittels Dot Blot beruht auf der Interaktion der Biotinreste mit ExtrAvidin<sup>®</sup>, einem tetrameren Protein, das vier hoch affine Bindungsstellen für Biotin aufweist. An ExtrAvidin<sup>®</sup> ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Nach Umsatz des Substrates BCIP kommt es zur Reduktion von NBT zu NBT-Formazan und folgend zu einem Farbumschlag. Das Resultat des Dot Blots und somit die Biotinylierung des sIL-6R sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Das nicht modifizierte Protein (Abb. 5.5, 1) führte, wie erwartet, zu keiner Farb-reaktion. Lediglich das biotinylierte Protein (Abb. 5.5, 2-4, farbige Dots) zeigte ein positives Signal in diesem gekoppelten Enzymtest.



**Abb. 5.5: Dot Blot zum Nachweis der Biotinylierung des sIL-6R.** Unter Verwendung des Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenzes konnte der sIL-6R an primären Aminogruppen biotinyliert werden. Nach Abtrennung von überschüssigem Reagenz erfolgte der Nachweis der Reaktion mittels ExtrAvidin<sup>®</sup>-Alkalischer Phosphatase und dem Substrat NBT-BCIP im Dot Blot. 1: 0,34  $\mu$ g nicht biotinylierter sIL-6R; 2: 0,34  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R; 3: 0,68  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R; 4: 1,0  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R.

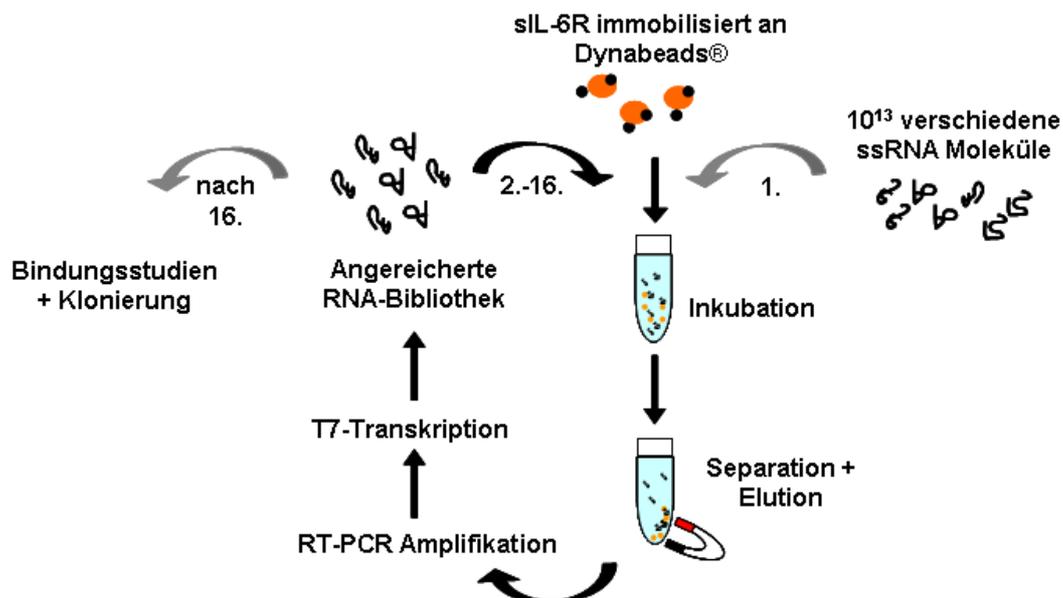
Um zu kontrollieren, ob der sIL-6R durch die Biotinylierung (4.3.3) degradiert wurde oder die Dialyse (4.3.4) zu deutlichen Proteinverlusten führte, wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. Neben dem PageRuler<sup>™</sup> Unstained Protein Ladder wurde eine Probe an biotinyliertem sIL-6R vor und nach erfolgter Dialyse auf das Gel aufgetragen (Abb. 5.6). Die Proteinbanden des sIL-6R (~ 50 kDa) waren sowohl vor als auch nach der Dialyse (Abb. 5.6, Spuren 2 und 3) deutlich und ohne Degradation zu erkennen. Nach erfolgter Biotinylierung wurde der sIL-6R auf der Oberfläche von Streptavidin-beschichteten Dynabeads<sup>®</sup> M-280 immobilisiert (4.3.6).



**Abb. 5.6: 15%iges SDS-PAA-Gel zum Nachweis von Verlusten oder Degradation des biotinylierten sIL-6R.** Nach Biotinylierung des sIL-6R unter Verwendung des Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz wurde eine SDS-PAGE zum Nachweis eventueller Proteindegradation durchgeführt. Dazu wurde eine Probe des sIL-6R (~ 50 kDa) vor und nach Abtrennung von überschüssigem Reagenz durch Dialyse auf das Gel aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Spur 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*; Spur 2: 1,0 µg biotinylierter sIL-6R vor Dialyse; Spur 3: 2,0 µg biotinylierter sIL-6R nach Dialyse.

### 5.1.3 Selektion sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere

Die Selektion sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere wurde unter Verwendung magnetischer Partikel durchgeführt, auf deren Oberfläche das Zielprotein immobilisiert wurde. Der Ablauf der Selektion ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

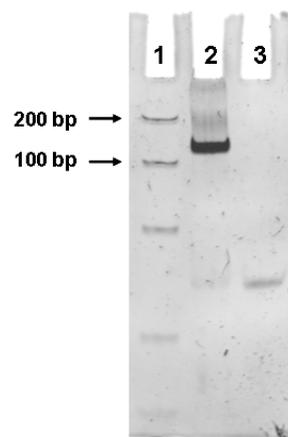


**Abb. 5.7: *In vitro* Selektion von sIL-6R-spezifischen RNA-Aptameren.** Für die erste Selektionsrunde wurden etwa  $10^{13}$  verschiedene RNA-Moleküle (106 nt) mit an Dynabeads® immobilisiertem sIL-6R inkubiert. Nach Abtrennung nicht bindender RNA-Moleküle mittels magnetischer Separation und Elution der bindenden Spezies erfolgte die Amplifikation mittels RT-PCR. Das Produkt wurde via T7-Transkription in eine angereicherte RNA-Bibliothek umgeschrieben und folgend die nächste Selektionsrunde gestartet. Nach 16 Runden wurde die Selektion beendet und die Bibliothek in Filterbindungsstudien erstmals auf Anreicherung analysiert und kloniert.

## 5 ERGEBNISSE

Die *in vitro* Selektion wurde, wie in 4.4 beschrieben, durchgeführt. Die Basis der zur Selektion verwendeten Puffer war 1x PBS, ein Phosphat-Puffersystem mit physiologischem pH-Wert. Durch seinen Salzgehalt ähnelt der osmotische Druck dieses Puffers dem osmotischen Druck des menschlichen Organismus, was für eine spätere Anwendung der Aptamere von großer Bedeutung sein könnte. Zusätzlich wurde dieser Selektionspuffer mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> komplettiert.

In der ersten Selektionsrunde wurden 500 pmol der RNA-Bibliothek R1 mit dem an Dynabeads<sup>®</sup>-immobilisierten, in 1x Kopplungspuffer C suspendierten sIL-6R (Tab. 3.3) inkubiert. Nicht-bindende RNA-Moleküle wurden durch einmaliges Waschen mit 1x Selektionspuffer B abgetrennt, bindende Spezies in aqua dest. unter Hitzeeinwirkung (80 °C) eluiert und mittels RT-PCR (4.2.4) amplifiziert. Die Kontrolle der Reaktion erfolgte am Ende jeder Selektionsrunde mittels nativer PAGE (10%iges PAA-Gel, 4.1.1) und ist exemplarisch für die 1. Runde in Abbildung 5.8 dargestellt. Bereits nach acht PCR-Zyklen ließ sich deutlich eine DNA-Bande bei 128 bp mit leichten Überamplifikaten erkennen (Abb. 5.8, Spur 2). Ein Kontrollansatz der RT-PCR ohne Template lieferte, wie erwartet, kein spezifisches PCR-Produkt (Abb. 5.8, Spur 3).



**Abb. 5.8: Analytisches natives 10%iges PAA-Gel zur Kontrolle der RT-PCR-Reaktion am Ende der ersten Selektionsrunde.** Die in der ersten Selektionsrunde eluierte RNA-Bibliothek wurde mittels reverser Transkription zurück in eine cDNA-Bibliothek überführt und mittels PCR zu dsDNA einer Länge von 128 bp amplifiziert. Spur 1: *Fast Ruler Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 2: dsDNA-Produkt nach acht PCR-Zyklen der Selektionsrunde 1; Spur 3: Kontrollansatz der RT-PCR ohne Template.

Das RT-PCR-Produkt wurde zum Start der zweiten Selektionsrunde einer 30 minütigen *in vitro* T7-Transkription unterzogen (4.2.7). Die transkribierte RNA-Bibliothek stellte den Ausgangspunkt für die folgende Selektionsrunde dar. Um den nötigen Selektionsdruck zu erzeugen, wurden die Waschschriffe während der Selektionsrunden schrittweise erhöht. In Tabelle 5.1 sind wichtige Bedingungen der einzelnen Selektionsrunden aufgelistet. Nach 16 Runden wurde die Selektion beendet. Ein erstes, deutliches Anzeichen für eine erfolgreiche

## 5 ERGEBNISSE

Selektion ließ sich in der starken Reduktion der benötigten PCR-Zyklen zur DNA-Amplifikation nach jeder Selektionsrunde erkennen. So reduzierte sich die Zahl von 18 PCR-Zyklen der Runde 5 auf nur vier PCR-Zyklen der Runde 13. Beachtet man dabei, dass im ersten PCR-Zyklus die cDNA zu dsDNA aufgefüllt wurde, erfolgte nach Überführung der RNA in DNA lediglich eine Verachtfachung der DNA-Menge.

**Tab. 5.1: Übersicht wichtiger Charakteristika der Selektionsrunden 1 bis 16.**

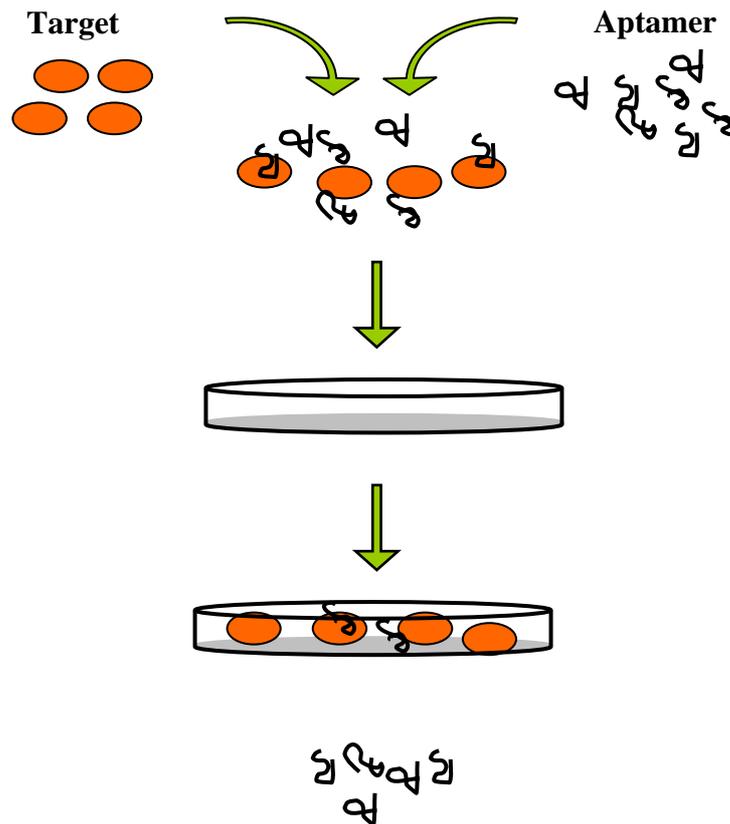
| Runde   | RNA-Menge/<br>Transkriptionsdauer | sIL-6R-Menge | Reaktionsvolumen | Waschschritte | PCR-<br>Zyklen |
|---------|-----------------------------------|--------------|------------------|---------------|----------------|
| 1*      | 500 pmol                          | 100 pmol     | 100 µl           | 1x 100 µl     | 8              |
| 2       | 30 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 1x 200 µl     | 19             |
| 3       | 30 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 2x 200 µl     | 20             |
| 4*      | 15 pmol                           | 100 pmol     | 100 µl           | 2x 200 µl     | 18             |
| 5       | 30 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 2x 200 µl     | 18             |
| 6       | 30 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 2x 200 µl     | 14             |
| 7       | 25 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 14             |
| 8       | 20 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 11             |
| 9       | 20 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 9              |
| 10      | 20 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 8              |
| 11      | 20 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 6              |
| 12      | 25 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 5              |
| 13 – 16 | 25 min                            | 100 pmol     | 100 µl           | 4x 200 µl     | 4              |

Die eingesetzten RNA-Mengen waren lediglich in der ersten (500 pmol) und vierten Runde (15 pmol) definiert, da zur Vorbereitung der RNA für diese beiden Selektionsrunden eine Gelreinigung (\*) stattgefunden hatte.

### 5.2 Erste Bindungsstudien der angereicherten RNA-Bibliothek an sIL-6R

Um erstmals eine Affinität und Wechselwirkung der RNA-Bibliothek nach 16 Selektionsrunden mit dem Zielmolekül sIL-6R zu zeigen, wurden Filterbindungsstudien unter radioaktiven Bedingungen durchgeführt (4.6.1). In Abb. 5.9 ist die Durchführung eines solchen Tests schematisch dargestellt. Zunächst wurden die RNA-Bibliotheken der jeweiligen Selektionsrunde unter Einbau von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP während der T7-Transkription radioaktiv markiert (4.2.8) und mittels PAGE (10%, denat.) kontrolliert (4.1.2). Abbildung 5.10 (A) zeigt die erfolgreiche Markierung der RNA-Ausgangsbibliothek (Runde 0; Spur 1) und der RNA-Bibliothek nach Runde 16 (Spur 2). Die Nummerierung der verwendeten RNA-Bibliotheken bezieht sich stets auf die jeweils beendete Selektionsrunde, d. h. die RNA-Bibliothek der Runde 16 entstammt einer T7-Transkription, deren Template das RT-PCR-Produkt der 16. Selektionsrunde war.

## 5 ERGEBNISSE



**Abb. 5.9: Filterbindungsstudie zur Untersuchung von Aptamer-Protein-Interaktionen.** Das Targetmolekül sIL-6R wurde mit radioaktiv markierter RNA inkubiert (4.6.1). Nach Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes erfolgte die Trennung nicht bindender RNA-Moleküle durch Filtration der Ansätze über Nitrozellulosemembranen. Diese Membranen besitzen die Eigenschaft, Proteine unspezifisch zu binden. RNA-Moleküle, die an das Zielprotein gebunden haben, wurden auf der Membran zurückgehalten, nicht-bindende Moleküle passierten die Membran. Durch Bestimmung der auf der Membran verbliebenen Menge an radioaktiv markierten Nucleinsäuren mittels Autoradiographie (4.1.5) konnte der Anteil bindender RNA-Moleküle ermittelt werden.

Die RNAs wurden anschließend in geringer Menge ( $< 1$  nM) mit dem Zielprotein sIL-6R (1 nM - 250 nM) in 1x Selektionspuffer B inkubiert. Durch Filtration der Reaktionsansätze über eine Nitrozellulosemembran konnten bindende von nicht-bindenden RNA-Molekülen getrennt werden. Die auf der Membran verbleibende Menge an radioaktiv markierten Nucleinsäuren wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Die in Abbildung 5.10 (B) gezeigte Filterbindungsstudie (4.6.1) wies deutlich auf eine Bindung der RNA-Bibliothek aus Runde 16 an das sIL-6R-Protein hin und zeigte, dass eine Anreicherung bindender Ribonucleinsäuren stattgefunden hatte. Die unselektierte RNA-Ausgangsbibliothek ließ keine Bindung an sIL-6R erkennen.



**Abb. 5.10: Filterbindungsstudie der nach 16 Selektionsrunden angereicherten RNA-Bibliothek und der unselektierten Ausgangsbibliothek (Runde 0) an sIL-6R.** **A)** Die RNA-Ausgangsbibliothek (Spur 1) und die RNA-Bibliothek nach Runde 16 (Spur 2) wurden durch den Einbau von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP während der T7-Transkription radioaktiv markiert (4.2.8) und mittels eines 10%igen PAA-Gel kontrolliert. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. **B)** Für die Bindungsstudie wurde das sIL-6R-Protein in steigender Konzentration (0 - 250 nM) mit der jeweiligen, radioaktiv markierten RNA-Bibliothek inkubiert, über eine Nitrozellulosemembran filtriert und die am Filter verbleibende Menge an radioaktiv markierter RNA mittels Autoradiographie detektiert. Die RNA-Bibliothek der Selektionsrunde 16 zeigte deutlich eine konzentrationsabhängige Bindung an den sIL-6R.

### 5.3 Klonierung und Sequenzierung der für sIL-6R spezifischen Bibliothek

Die Anreicherung der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere wurde nach 16 Selektionsrunden beendet. Das Resultat stellte eine polyklonale Bibliothek verschiedener RNA-Moleküle mit möglicherweise unterschiedlichen Bindungseigenschaften für den sIL-6R dar. Wie bereits erwähnt, lag ein Anzeichen für eine erfolgreiche Aptamer-Selektion in der Verringerung der zur DNA-Amplifikation notwendigen Anzahl an PCR-Zyklen von Selektionsrunde zu Selektionsrunde. Da bereits die RNA-Bibliothek der neunten Selektionsrunde das Vorhandensein bindender Spezies vermuten ließ, wurde sowohl die dsDNA-Bibliothek der Selektionsrunde 9 als auch die finale Bibliothek der Runde 16 in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> kloniert (4.5.1). Folgend wurden acht Klone der 9. Selektionsrunde und zwölf Klone der 16. Selektionsrunde sequenziert (4.5.5). Die Sequenzierung ergab insgesamt sechs verschiedene Aptamersequenzen (Tab. 5.2). Am häufigsten war dabei der Klon 16-1 vorhanden.

**Tab. 5.2: Häufigkeit der sechs erhaltenen RNA-Aptamere.**

| Aptamer | Gesamtzahl an Kopien | Kopien in Runde 9 | Kopien in Runde 16 |
|---------|----------------------|-------------------|--------------------|
| 16-1    | 11                   | 3                 | 8                  |
| 16-3    | 3                    | 1                 | 2                  |
| 16-2    | 2                    | 1                 | 1                  |
| 16-8    | 2                    | 1                 | 1                  |
| 9-5     | 1                    | 1                 | 0                  |
| 9-6     | 1                    | 1                 | 0                  |

Aufgelistet ist die Gesamtkopienzahl einer Sequenz aus 20 analysierten Klonen. Zusätzlich gezeigt ist deren Zuordnung zur jeweiligen Selektionsrunde, wobei zwölf Klone der Runde 16 und acht Klone der Runde 9 entstammten.

## 5 ERGEBNISSE

Wie das Alignment in Abbildung 5.11 zeigt, zeichneten sich alle Sequenzen durch ein gemeinsames, G-reiches (blau) Konsensusmotiv 5' -GGGGHGGCWGUGGWGWGGG-3' aus, wobei H für die Basen Adenin, Uracil oder Cytosin bzw. W für die Basen Adenin oder Uracil stehen kann. Die einzigen beiden konservierten, von Guanin abweichenden Basen waren ein Cytosin- und ein Uracilrest (grün). Die Abbildung 5.11 zeigt die Sequenzen der 6 Klone, wobei die Basen des Konsensusmotivs farbig hervorgehoben sind.

```
16-1  GU-----CAUGGGGGUGGCGUGUGGUGUGGGUGUGAAGGGCAUUAUGUCGCUGACUGUGCGUUAGC
16-3  CU-----UAUAGGGGAGGCGUGUGGUGAGGGAAUAUUAAGAGAAUUAACGGUCUAGUUCACCUCGA
16-2  AACGUCUUACGGAUUCUACCAGGGGGCGGCGUGUGGAGUGGGGGU-----UGGAGUCCGAUAAG-----GU
16-8  GUG-----CUUACCUUACUCGGGGUGGCGAGUGGAGUGGG-----AAACAGUAAGGUGCGCAUG----GUUUAG
9-5   CUG--UGAGCG-----CUUUGGGGUGGCGUGUGGAGAGGGUAUGCAGCUCUAGGGUAUUCAGCUUC-----UG
9-6   GU-----CCUGGGGGCGGCGUGUGGUGUGGGUGUGAAGGGCAUUAUGUCGCUGACUGUGCGUUAGC
```

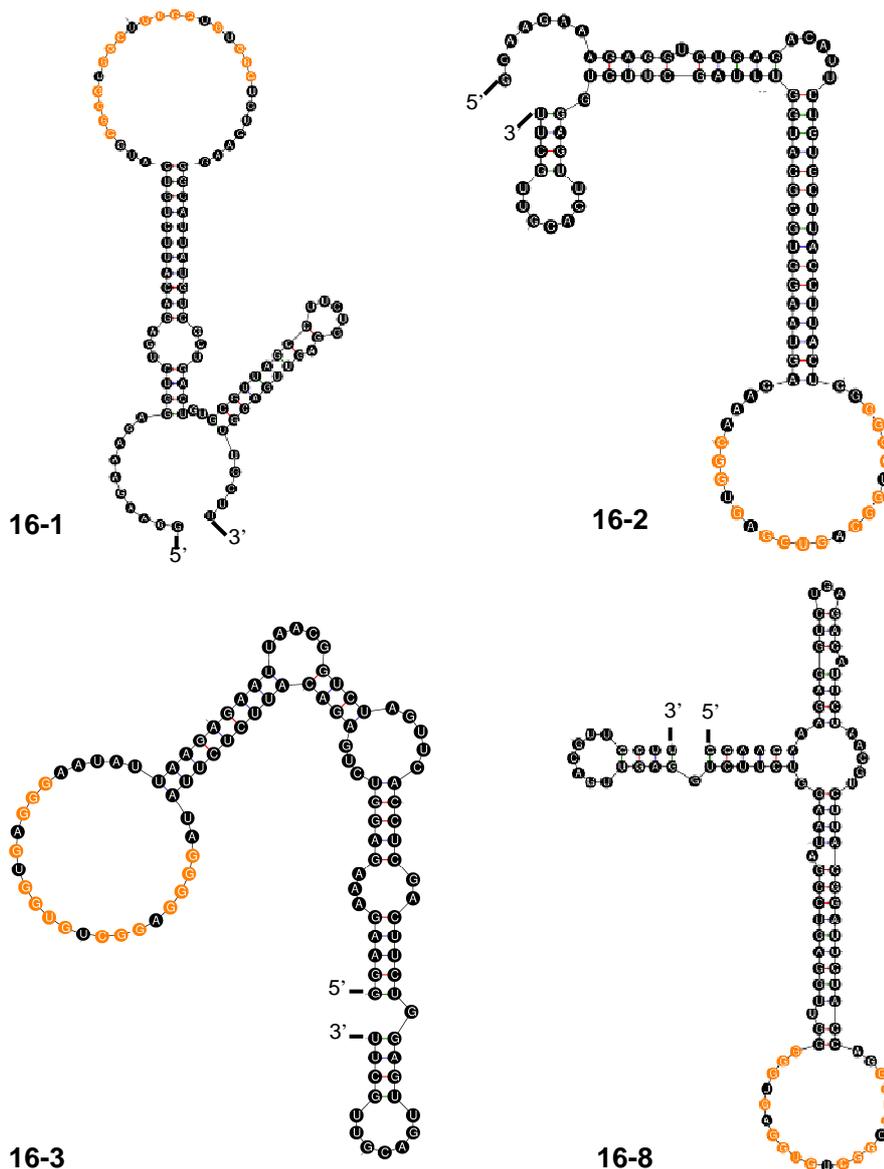
**Abb. 5.11: Sequenzvergleich monoklonaler Aptamere der angereicherten RNA-Bibliothek R1 nach 9 und 16 Selektionsrunden unter Verwendung des Programms ClustalW2.** Gezeigt sind die 60 randomisierten Nukleotide der sechs erhaltenen Aptamersequenzen in 5'-3'-Richtung. Auf eine Darstellung der 5'- bzw. 3'-konstanten Region der Aptamere wurde verzichtet. Die Bezeichnung jeder Sequenz setzt sich aus zwei Ziffern zusammen: die Erste entspricht der Selektionsrunde (9 bzw. 16), die Zweite entspricht der Nummer des jeweiligen Klons. Die in farbigen Lettern dargestellten Nukleotide sind in allen Sequenzen identisch und stellen das Konsensusmotiv dar. In blau sind dabei Guaninreste gekennzeichnet. Konservierte, von Guanin verschiedene Reste sind grün markiert.

## 5.4 Charakterisierung der sIL-6R spezifischen RNA-Aptamere

### 5.4.1 Sekundärstrukturanalyse

Zur Sekundärstrukturanalyse wurden die vier häufigsten sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere 16-1, 16-2, 16-3 und 16-8 ausgewählt und mit dem Programm *mfold web server* (Version 3.2), welches 2003 von Michael Zuker im Internet zur freien Verfügung gestellt wurde [81], analysiert. Ziel dieses Webservers ist der einfache Zugang zur RNA- und DNA-Faltung. Detaillierte Angaben resultierender Strukturen und minimaler Energien als Konsequenz der Faltung einzelsträngiger Nukleinsäuresequenzen wurden somit möglich.

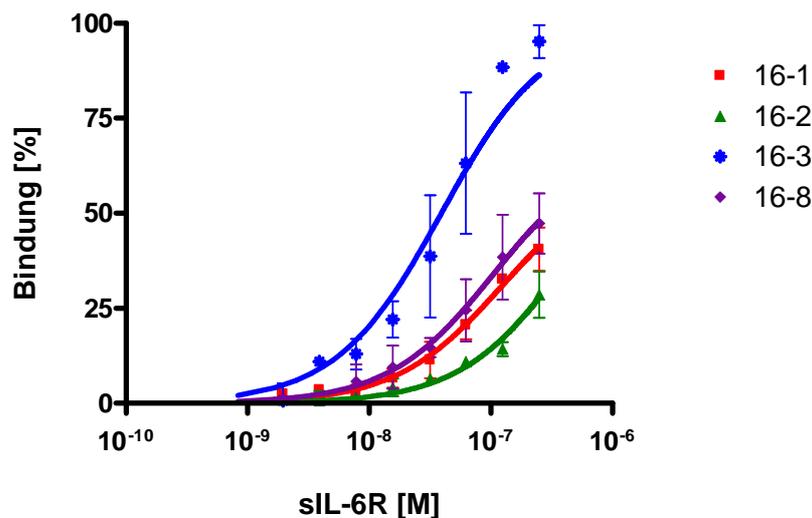
Das gehäufte Vorkommen von Guaninbasen in der konservierten Aptamersequenz ließ vermuten, dass die RNA-Aptamere intramolekulare G-Quadruplexe ausbilden können. G-Quadruplexe sind lipophile, viersträngige Strukturen, die durch Interaktion planarer Guanin-Tetraden (sogenannter G-Quartette) entstehen können [82]. Diese G-Quartette sind durch Selbstorganisation von Guanosinresten gebildete Makrocyclen, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden [82]. Da diese Tertiärstrukturen während der Sekundärstrukturanalyse nicht berücksichtigt werden, wurden die Sekundärstrukturen mit Hilfe des *mfold web server* ermittelt, unter der Bedingung, dass der konservierte Bereich keine Basenpaarungen eingehen sollte. In allen Sekundärstrukturen lag das Konsensusmotiv nun als Loopstruktur vor, jeweils stabilisiert von einem doppelsträngigen Bereich (Abb. 5.12).



**Abb. 5.12:** Sekundärstrukturanalyse vier ausgewählter sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere unter Verwendung des Programms *mfold web server* [81]. Gezeigt ist die jeweils energetisch günstigste Sekundärstruktur der Aptamere unter der Einschränkung, dass innerhalb der G-reichen, konservierten Region keine Basenpaarungen erfolgen sollten. Bei den ersten 25 und den letzten 23 Nukleotiden jeder Sequenz handelt es sich um die 5'- bzw. 3'-konstante Region der Aptamere. Der von den konstanten Regionen flankierte, jeweils individuelle Sequenzbereich ist 60 nt lang. Konservierte Basen sind orange gekennzeichnet.

#### 5.4.2 Filterbindungsstudien sIL-6R spezifischer RNA-Aptamere

Für die vier Aptamere 16-1, 16-2, 16-3 und 16-8 wurde die Bindung an den sIL-6R analysiert. Die nach Durchführung der Bindungsstudie auf der Nitrozellulosemembran verbleibende Menge an radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde quantifiziert (4.5.1; 4.6.1) und zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten herangezogen (4.6.1). Die Abbildung 5.13 stellt die graphische Auswertung dieser Studie dar.



**Abb. 5.13: Bindung der Aptamere 16-1, 16-2, 16-3 und 16-8 an sIL-6R.** Der Anteil gebundener RNA (in %) bei einer definierten sIL-6R-Konzentration wurde in Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zweier voneinander unabhängiger Experimente. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

Anhand dieser Filterbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten RNA-Aptamere ihr Zielmolekül in Lösung binden konnten und ähnliche Bindungseigenschaften aufwiesen (Abb. 5.13). Die dazugehörigen, ermittelten Dissoziationskonstanten lagen in etwa im Bereich einer Größenordnung (Tab. 5.3)

**Tab. 5.3: Charakteristika der Aptamere 16-1, 16-2, 16-3 und 16-8.**

| Aptamer | Anteil maximaler Bindung [%] | $K_d$ [nM]    |
|---------|------------------------------|---------------|
| 16-1    | 61,4                         | $125 \pm 32$  |
| 16-2    | 74,5                         | $420 \pm 290$ |
| 16-3    | 100,0                        | $39 \pm 14$   |
| 16-8    | 68,2                         | $106 \pm 47$  |

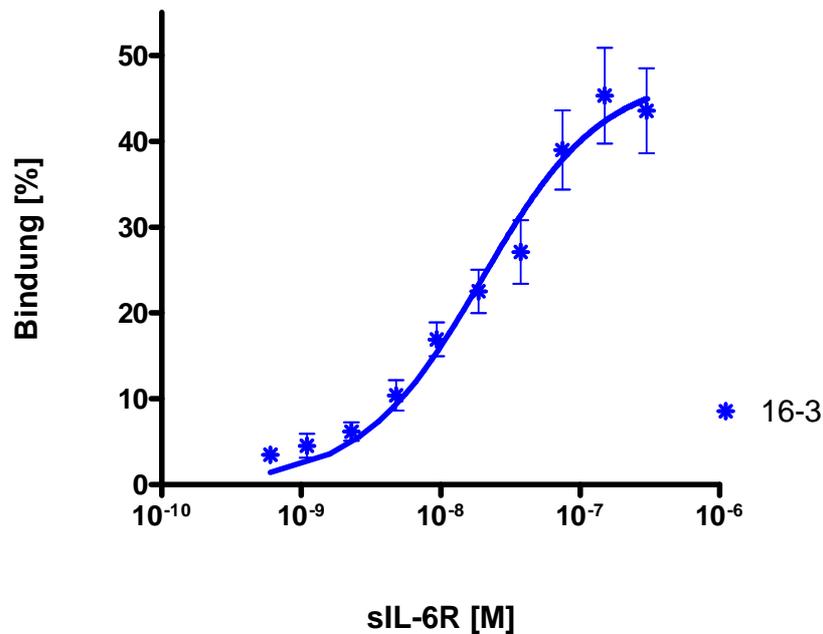
Aufgelistet sind die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) und der Anteil an maximal gebundener RNA ermittelt in zwei unabhängigen Filterbindungsstudien.

Das Aptamer 16-3 wies mit einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von 39,2 nM eine sehr affine Bindung an den sIL-6R auf. Der Anteil an RNA, der maximal an den sIL-6R binden kann, ist für jedes Aptamer in Tabelle 5.3 angegeben. Da zur Untersuchung der Interaktion zwischen RNA und Protein die RNA in deutlichem Überschuss vorlag, wurde davon ausgegangen, dass maximal ein RNA-Molekül pro sIL-6R binden konnte.

## 5 ERGEBNISSE

Dies begründet die Anwendung des *One-Site-Binding*-Modells zur Ermittlung der  $K_d$ -Werte und prozentualen Anteile an gebundener RNA. Der Anteil an gebundener RNA kann theoretisch bei maximal 100% liegen. Liegt ein Teil der RNA degradiert bzw. nicht korrekt gefaltet vor oder bindet nicht das gesamte Protein an die Nitrozellulosemembran, so verringert sich dieser Wert.

Das Aptamer 16-1 zeigte das häufigste Vorkommen im RNA-Pool nach der 16. Selektionsrunde (Tab. 5.2). Da das Aptamer 16-3 jedoch im Vergleich zu 16-1 und den anderen zwei Aptameren die höchste Affinität zum sIL-6R in dieser ersten Bindungsstudie zeigte, wurde dieses für weitere Untersuchungen herangezogen. Zunächst wurde eine größere Anzahl an Filterbindungsstudien durchgeführt, um die Dissoziationskonstante mit möglichst geringer Standardabweichung angeben zu können (Abb. 5.14).

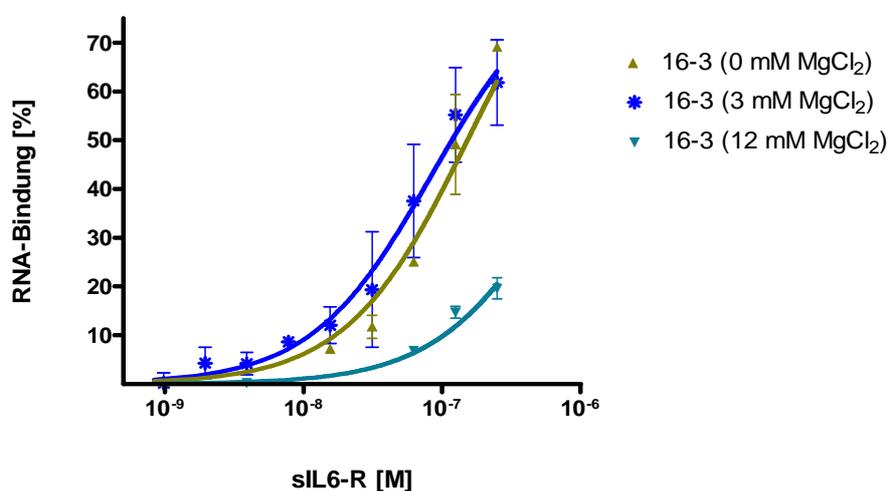


**Abb. 5.14: Bindung des Aptamers 16-3 an das Zielmolekül sIL-6R.** Der Anteil des gebundenen RNA-Aptamers 16-3 (in %) wurde bei definierten sIL-6R-Konzentrationen in Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zehn voneinander unabhängiger Studien. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

Nach zehn voneinander unabhängigen Studien konnten eine Dissoziationskonstante von etwa  $19,8 \pm 4,2$  nM und ein Anteil der maximal möglichen Aptamer-Bindung von  $47,9 \pm 2,8$  % für das ausgewählte Aptamer 16-3 ermittelt werden.

### 5.4.3 Abhängigkeit der Aptamerbindung von Magnesiumionen und vom pH-Wert

Zweiwertige Kationen, wie beispielweise  $Mg^{2+}$ , stabilisieren Nukleinsäuren und sind oftmals essentiell für deren dreidimensionale Faltung [83]. Magnesium war standardmäßig in dem Selektionspuffer B mit einer Endkonzentration von 3 mM enthalten. Filterbindungsstudien (4.6.1) zur Untersuchung einer Magnesiumabhängigkeit zeigten, dass das sIL-6R-spezifische Aptamer 16-3 ohne Zusatz von  $Mg^{2+}$ -Ionen (Selektionspuffer A) keine drastische Affinitätsänderung zum Targetprotein aufwies (Abb. 5.15). Daher schienen  $Mg^{2+}$ -Ionen für die dreidimensionale Faltung der RNA und deren Bindung an das Zielmolekül nicht essentiell zu sein (Tab. 5.4).  $Mg^{2+}$ -Ionen könnten in Spuren vorhanden gewesen sein, da dem Selektionspuffer A kein EDTA zugefügt wurde.



**Abb. 5.15: Bindung des Aptamers 16-3 an das Zielmolekül sIL-6R in Abhängigkeit variierender  $MgCl_2$ -Konzentrationen.** Der Anteil des gebundenen RNA-Aptamers 16-3 (in %) wurde bei definierten sIL-6R-Konzentrationen in Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und in Abhängigkeit der sIL-6R-Konzentration graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zweier voneinander unabhängiger Studien. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

Eine Reduktion der Bindungsaffinität konnte bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 12 mM (Selektionspuffer C) beobachtet werden. Hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen führten möglicherweise zur Ausbildung alternativer RNA-Strukturen, die keine Interaktion mit dem sIL-6R zeigten.

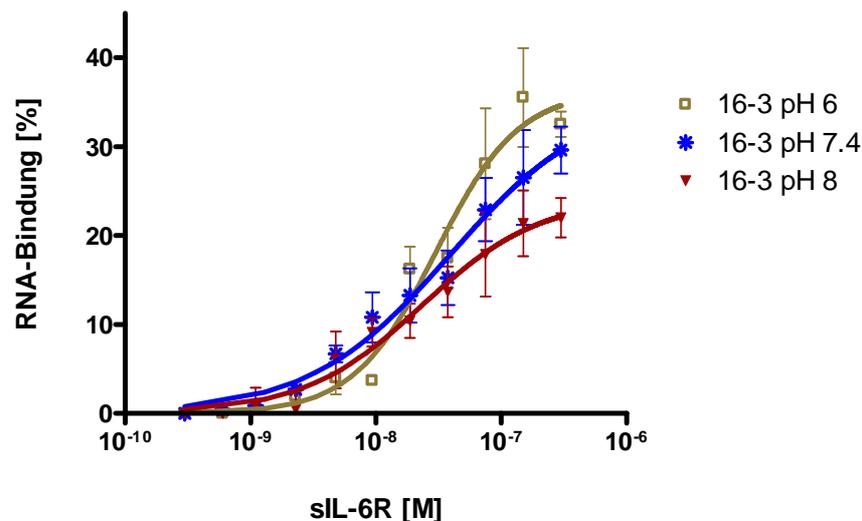
**Tab. 5.4:  $MgCl_2$ -Abhängigkeit der Aptamerbindung an sIL-6R.**

| Aptamer | $MgCl_2$ | $K_d$ [nM]    | Anteil maximaler Bindung [%] |
|---------|----------|---------------|------------------------------|
| 16-3    | 0 mM     | $152 \pm 53$  | $100 \pm 18$                 |
| 16-3    | 3 mM     | $84 \pm 31$   | $85 \pm 13$                  |
| 16-3    | 12 mM    | $700 \pm 700$ | $78 \pm 61$                  |

Gelistet sind  $K_d$ -Werte und der Anteil maximal gebundener RNA aus zwei unabhängigen Filterbindungsstudien.

## 5 ERGEBNISSE

Bedingt durch die funktionellen Gruppen von Ribonukleinsäuren und Proteinen, wie Carboxyl- oder Aminogruppen, können die Strukturen und Reaktivitäten des RNA-Aptamers 16-3 oder des sIL-6R und damit deren Interaktionsfähigkeit vom pH-Wert beeinflussbar sein. Die Wirkung des pH-Wertes auf diese Interaktion sollte mit Hilfe von Filterbindungsstudien analysiert werden (4.6.1). Dazu wurde der 1x Selektionspuffer B auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt und die pH-Abhängigkeit in einem Bereich von pH 6,0 bis pH 8,0 getestet (Abb. 5.16).



**Abb. 5.16: Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung des Aptamers 16-3 an das Zielmolekül sIL-6R.** Der Anteil des gebundenen RNA-Aptamers 16-3 (in %) bei definierten sIL-6R-Konzentrationen wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert in Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und den sIL-6R-Konzentrationen entsprechend graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zweier voneinander unabhängiger Studien. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

Die Selektion der Aptamere erfolgte bei einem pH-Wert von 7,4. Das Aptamer 16-3 zeigte innerhalb des getesteten pH-Bereiches keine Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität zum sIL-6R. Eine Verschiebung des pH-Wertes in Richtung alkalisches oder saures Milieu hatte keinen Einfluss auf die resultierenden  $K_d$ -Werte von etwa 30 nM (Tab. 5.5).

Der Anteil der maximal möglichen RNA-Bindung zeigte eine schwache Abhängigkeit vom pH-Wert (Tab. 5.5), so sank der Anteil der maximalen Aptamerbindung von etwa  $40 \pm 4$  % bei pH 6,0 auf etwa  $23 \pm 2$  % bei pH 8,0. Möglicherweise führte eine Erhöhung des pH-Wertes zur Destabilisierung bindender RNA-Strukturen, so dass der Anteil zu einer sIL-6R-Interaktion befähigter Moleküle verringert war.

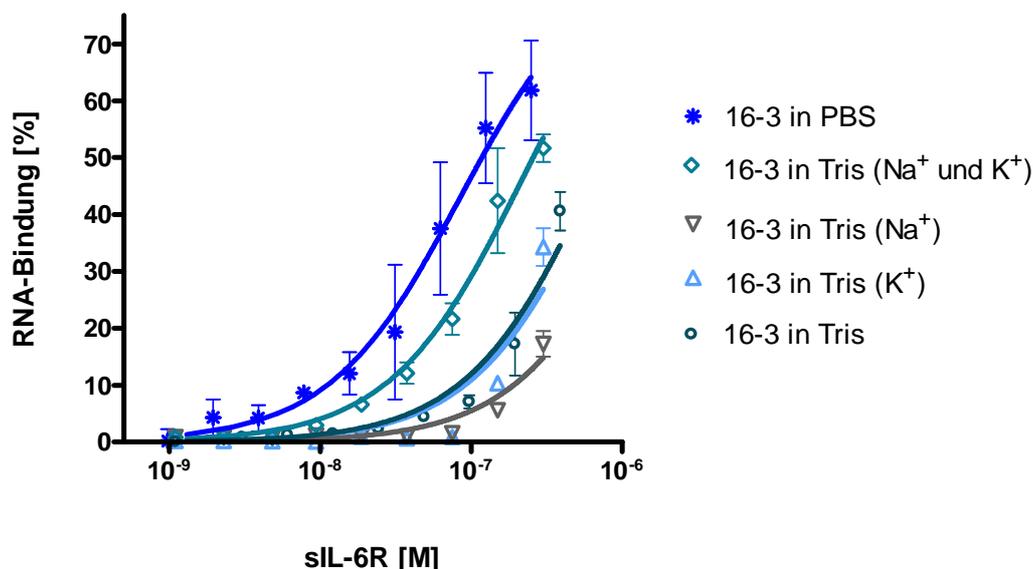
**Tab. 5.5: Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung des Aptamers 16-3 an sIL-6R.**

| Aptamer | pH-Wert | $K_d$ [nM]  | Anteil maximaler Bindung [%] |
|---------|---------|-------------|------------------------------|
| 16-3    | 6,0     | $37 \pm 12$ | $40 \pm 4$                   |
| 16-3    | 7,4     | $25 \pm 7$  | $30 \pm 2$                   |
| 16-3    | 8,0     | $20 \pm 7$  | $23 \pm 2$                   |

Aufgelistet sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) und des Anteils an maximal gebundener RNA ermittelt in vier unabhängigen Filterbindungsstudien.

#### 5.4.4 Einfluss monovalenter Kationen auf die Aptamerbindung

Viele Tertiärstrukturen von Ribonukleinsäuren sind bereits in Gegenwart monovalenter Kationen, wie zum Beispiel Natrium und Kalium, stabil [84]. Eine  $K^+$ - bzw.  $Na^+$ -Abhängigkeit von Nukleinsäurestrukturen wurde beispielsweise bei der Formation von G-Quadruplexen festgestellt. Diese spezielle Anordnung von Guaninbasen im Zentrum einer viersträngigen, helikalen Struktur wird stabilisiert durch eine achtfache Koordination monovalenter Kationen [84]. Der für die *in vitro* Selektion verwendete 1x Selektionspuffer B stellte ein Phosphatpuffersystem mit einem pH-Wert von 7,4 dar, welches sich aus der schwachen Säure  $H_2PO_4^-$  und der konjugierter Base  $HPO_4^{2-}$  zusammensetzte. Zusätzlich beinhaltete dieser Puffer 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl und somit die zur Ausbildung von Tertiärstrukturen wichtigen Kationen.



**Abb. 5.17: Bindung des Aptamers 16-3 an das Zielmolekül sIL-6R in Abhängigkeit monovalenter Kationen.** Der Anteil des gebundenen RNA-Aptamers 16-3 (in %) bei definierten sIL-6R-Konzentrationen wurde in Abhängigkeit monovalenter Kationen im Puffersystem durch Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und den sIL-6R-Konzentrationen entsprechend graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken ergeben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zweier voneinander unabhängiger Messungen. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

## 5 ERGEBNISSE

In Filterbindungsstudien sollte neben dem Einfluss des Puffersystems auch die Abhängigkeit von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen auf die Aptamerbindung verdeutlicht werden. Als Vergleich zum 1x Selektionspuffer A, bei welchem auf die Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  verzichtet wurde, diente der 1x Tris-Puffer A mit einem pH-Wert von ebenfalls 7,4. Diesem Puffer wurden die Salze NaCl, KCl oder beide Salze schrittweise so zugesetzt, dass deren Endkonzentrationen mit den entsprechenden Salzkonzentrationen des PBS-Puffers vergleichbar waren (Abb. 5.17).

Zwischen den beiden verschiedenen Puffersystemen (PBS-Puffer und Tris-Puffer) waren bereits Unterschiede im Bindungsverhalten des Aptamers 16-3 an den sIL-6R zu verzeichnen. Trotz der Anwesenheit von 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl in beiden Puffern verringerte sich die Dissoziationskonstante des Aptamers von etwa 84 nM (1x Selektionspuffer B) auf 216 nM in 1x Tris-Puffer A. Die Abwesenheit von KCl bzw. NaCl oder auch beider monovalenter Kationen im 1x Tris-Puffer A führte zu einer deutlichen Reduktion der Bindungsaffinität. Charakteristische  $K_d$ -Werte lagen im höheren nanomolaren Bereich (Tab. 5.6).

**Tab. 5.6: Einfluss des Puffersystems und variierender Ionenkonzentrationen auf die Bindung des Aptamers 16-3 an sIL-6R.**

| Aptamer | Puffer                      | Ionen                        | $K_d$ [nM]      |
|---------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|
| 16-3    | 1x Selektionspuffer B (PBS) | $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ | $84 \pm 31$     |
| 16-3    | 1x Tris-Puffer A            | $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ | $216 \pm 65$    |
| 16-3    | 1x Tris-Puffer A            | $\text{K}^+$                 | $816 \pm 1193$  |
| 16-3    | 1x Tris-Puffer A            | $\text{Na}^+$                | $1721 \pm 3460$ |
| 16-3    | 1x Tris-Puffer A            | -                            | $736 \pm 542$   |

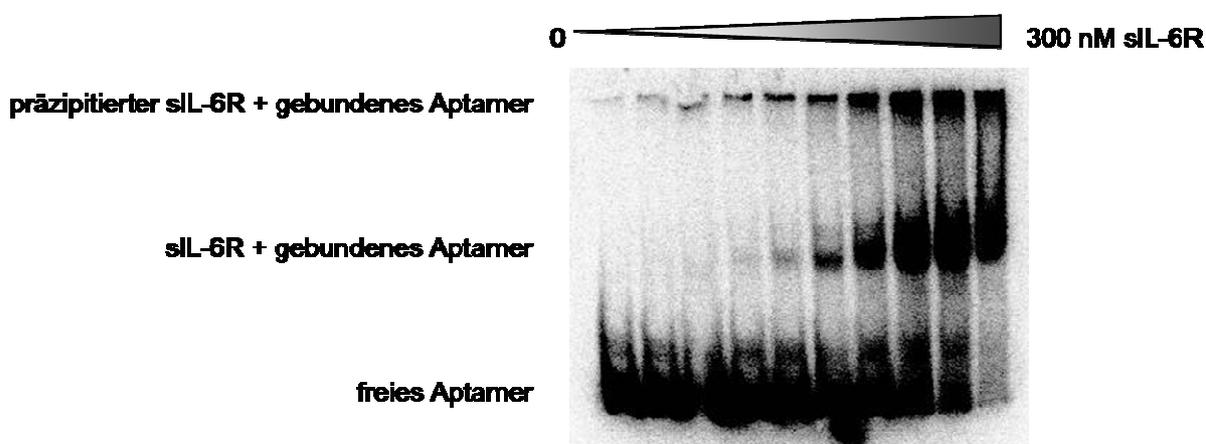
Aufgelistet sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) ermittelt in zwei unabhängigen Filterbindungsstudien.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass für eine eindeutige Determination der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) weitere Messpunkte bei höheren Proteinkonzentrationen notwendig gewesen wären, um in den Sättigungsbereich zu gelangen. So lassen sich auch die hohen Standardabweichungen der angegebenen  $K_d$ -Werte begünden.

Zusammenfassend führten die Änderung des Puffersystems und vor allem die Abwesenheit monovalenter Kationen im Puffer zu einem deutlichen Affinitätsverlust des RNA-Aptamers 16-3 zum Zielprotein sIL-6R.

#### 5.4.5 *Gel-Shift*-Assay zur Analyse der sIL-6R-Aptamer-Interaktion

Zur weiteren Analyse der spezifischen Interaktion zwischen dem *in vitro* selektierten Aptamer 16-3 und dem Zielprotein sIL-6R wurden *Gel-Shift*-Experimente durchgeführt. Dazu wurde das radioaktiv markierte Aptamer 16-3 mit steigenden Mengen an rekombinantem sIL-6R (0 nM – 300 nM) in 1x Selektionspuffer B inkubiert. Die Trennung der Aptamer-Protein-Gemische erfolgte über ein 5%iges, natives PAA-Gel (4.6.2). Die spezifische Bindung der RNA an das Targetmolekül verlangsamte das Laufverhalten im Vergleich zum Aptamer allein durch Formation der Aptamer-Protein-Komplexe. Diese Komplexe wurden im Gel als sogenannter „*Shift*“ deutlich. Mittels Autoradiographie konnten die resultierenden Banden visualisiert werden (Abb. 5.18).

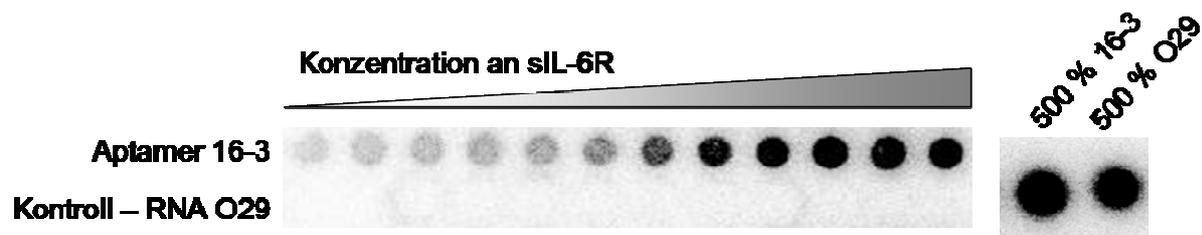


**Abb. 5.18:** *Gel-Shift*-Assay zur Analyse der Interaktion zwischen Aptamer 16-3 und sIL-6R. Die Interaktion von radioaktiv markiertem Aptamer 16-3 mit steigenden Konzentrationen an sIL-6R (0 nM - 300 nM) wurde mittels *Gel-Shift*-Assay (5%iges, natives PAA-Gel) nachgewiesen (4.6.2). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der im Wanderungsverhalten verlangsamten sIL-6R-Aptamer-Komplexe.

Das untersuchte Aptamer 16-3 zeigte deutlich eine Interaktion mit dem sIL-6R, da im Gel ein durch die Komplexbildung hervorgerufener *Shift* zu erkennen war (Abb. 5.18). Die Intensität dieser verlangsamten Bande wurde mit zunehmender sIL-6R-Konzentration stärker (Abb. 5.18, von links nach rechts). Im Bereich der Geltaschen ist ebenfalls eine konzentrationsabhängige Signalzunahme erkennbar. Vermutlich handelte es sich dabei um das Aptamer 16-3, welches mit präzipitiertem sIL-6R komplexiert vorlag.

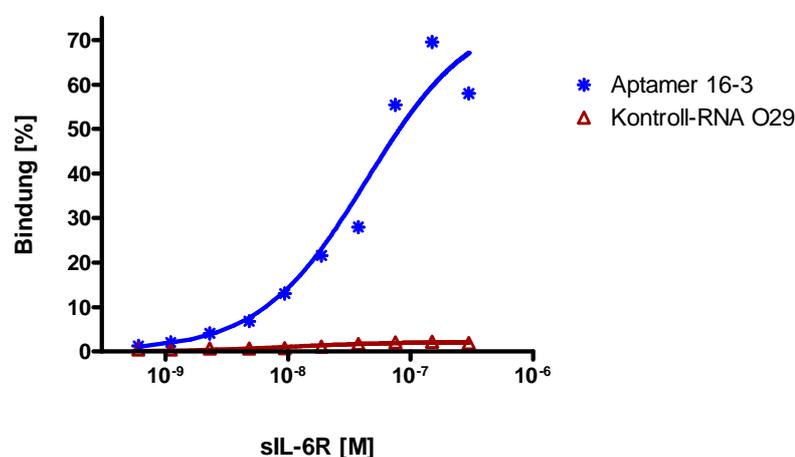
### 5.4.6 Analyse der Aptamerspezifität

Zur Charakterisierung der Aptamer-Spezifität wurde neben der Bindung des Aptamers 16-3 an das Zielprotein sIL-6R auch die Bindung der Kontroll-RNA O29 in einer Filterbindungsstudie (4.6.1) untersucht (Abb. 5.19). Die als Negativkontrolle dienende RNA O29 war 70 nt lang und wies im Gegensatz zu den sIL-6R-spezifischen Aptameren kein Guanodin-reiches Sequenzmotiv auf.



**Abb. 5.19: Filterbindungsstudie des RNA-Aptamers 16-3 und der Kontroll-RNA O29 an sIL-6R.** Das sIL-6R-Protein wurde in steigender Konzentration (0 – 300 nM) mit der jeweiligen, radioaktiv markierten RNA (< 1 nM) inkubiert und filtriert (4.6.1). Die mittels Autoradiographie detektierten, auf dem Filter verbliebenen Mengen markierter RNAs sind veranschaulicht. Zur Berechnung des prozentualen Anteils an gebundenem Aptamer wurde jeweils eine definierte Menge (500 %) an radioaktiv markierter RNA auf die Membran aufgetragen. Es handelt sich um eine Einfachbestimmung.

Das Aptamer 16-3 zeigte erneut eine hoch affine Bindung ( $K_d \sim 43$  nM) an den sIL-6R. Zwischen der RNA O29 und dem sIL-6R war keine Interaktion nachweisbar (Abb. 5.20).

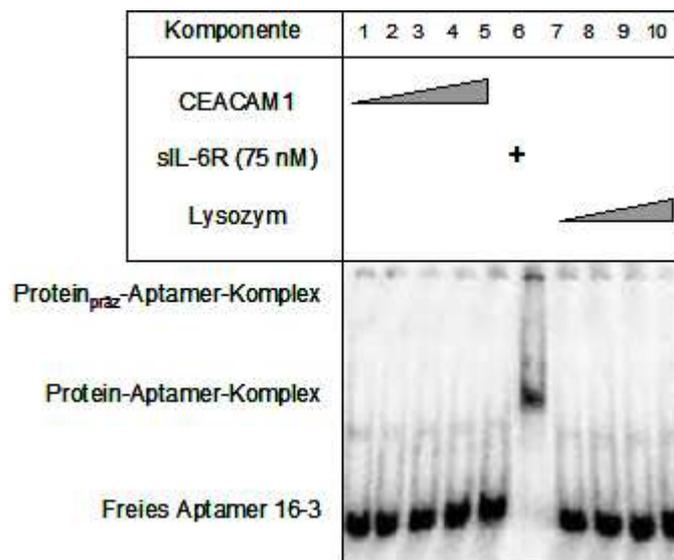


**Abb. 5.20: Bindung des Aptamers 16-3 und der Kontroll-RNA O29 an das Zielmolekül sIL-6R.** Die Anteile an gebundenem RNA-Aptamer 16-3 bzw. Kontroll-RNA O29 (in %) bei definierten sIL-6R-Konzentrationen wurden in einer Filterbindungsstudie (4.6.1) ermittelt und den sIL-6R-Konzentrationen entsprechend graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding-Modells* (4.6.1). Es handelte sich hierbei um eine Einfachbestimmung.

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde die Bindung der Kontroll-RNA R24 (Tab. 3.5), welche einer im Arbeitskreis von Professor Hahn durchgeführten Selektion gegen p53 entstammte (unveröffentlichte Daten), an sIL-6R getestet. Diese Daten ähnelten der hier exemplarisch gezeigten Bindungsstudie und wurden daher nicht zusätzlich dargestellt.

## 5 ERGEBNISSE

Um zu zeigen, dass die Wechselwirkung der selektierten RNA-Aptamere spezifisch für das Zielmolekül sIL-6R war, wurde ein *Gel-Shift*-Experiment unter nativen Bedingungen mit zwei rekombinant-produzierten Kontrollproteinen durchgeführt. Bei diesen Proteinen handelte es sich zum einen um CEACAM1, ein Zelladhäsionsmolekül, welches analog zum sIL-6R einen C-terminalen His-Tag trug (3.4). Das andere Protein war Lysozym, ein Enzym, das Polysaccharide prokaryotischer Zellwände spalten kann. Beide dieser Proteine sollten keine Interaktion mit den sIL-6R-spezifischen Ribonukleinsäuren eingehen.



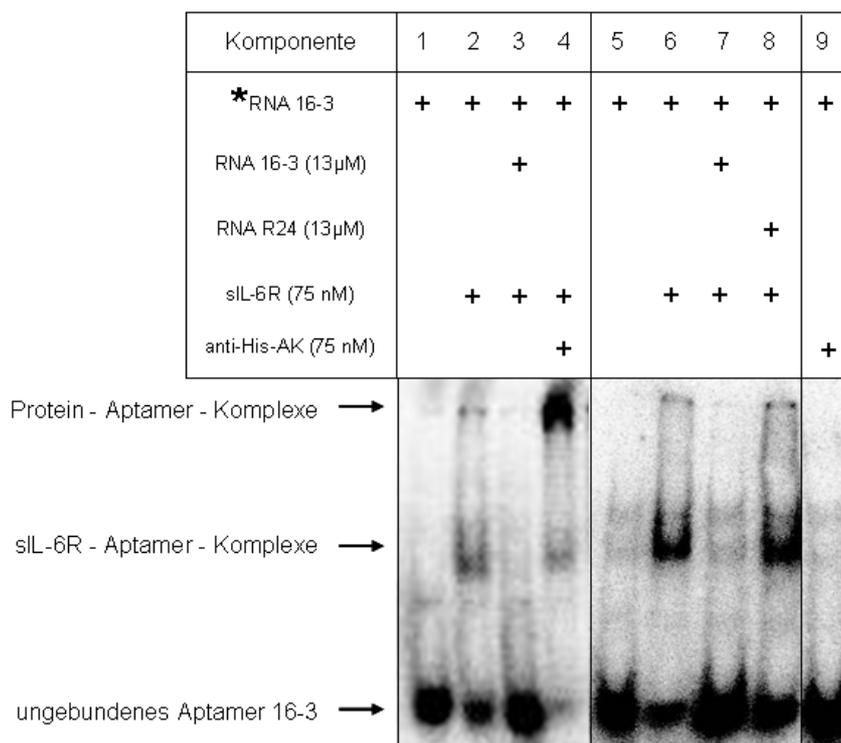
**Abb. 5.21: *Gel-Shift*-Assay zur Analyse der spezifischen Interaktion zwischen Aptamer 16-3 und dem Zielmolekül sIL-6R unter Verwendung zweier Kontrollproteine.** Das Aptamer 16-3 wurde auf eine Interaktion mit den Kontrollproteinen CEACAM1 (Spuren 2-5: 10 nM - 300 nM) und Lysozym (Spuren 7-10: 10 nM - 300 nM) mittels *Gel-Shift*-Assay in einem 5%igen, nativen PAA-Gel analysiert (4.6.2). Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit sIL-6R (75 nM, Spur 6). Es zeigte sich lediglich ein Shift der sIL-6R-Aptamer-Komplexe.

Zur Analyse der Spezifität wurden steigende Mengen (10 nM - 300 nM) an CEACAM1 (Abb. 5.21, Spuren 2-5) bzw. Lysozym (Abb. 5.21, Spuren 7-10) mit dem radioaktiv markierten Aptamer 16-3 (< 1 nM) in 1x Selektionspuffer B inkubiert und über ein 5%iges, natives PAA-Gel getrennt (4.6.2). Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 75 nM sIL-6R (Abb. 5.21, Spur 6). Keines der untersuchten Kontrollproteine wies eine Interaktion mit dem RNA-Aptamer 16-3 auf. Im Gegensatz dazu erfolgte eine Komplexbildung zwischen sIL-6R und dem Aptamer, was durch den *Shift* zu erkennen war (Abb. 5.21, Spur 6).

Der Nachweis, dass die in ihrem Laufverhalten verzögerte RNA-Bande wirklich auf einer spezifischen Interaktion zwischen Aptamer und sIL-6R zurückzuführen war, erfolgte durch zwei weitere *Gel-Shift*-Experimente (Abb. 5.22). Neben dem radioaktiv markierten Aptamer 16-3 (Abb. 5.22, Spur 1 und Spur 5) im Komplex mit sIL-6R (Spur 2, Spur 6) wurde ein > 1.000fach molarer Überschuss an nicht markiertem Aptamer zugesetzt (Spur 3, Spur 7). Die

## 5 ERGEBNISSE

markierten und unmarkierten RNA-Moleküle konkurrierten dabei um die Bindung an den löslichen sIL-6R, wodurch es zur Abschwächung der retardierten Bande kam (Kompetition). Zur Kontrolle wurde eine Kompetition zwischen Aptamer 16-3 und unmarkierter, unspezifischer RNA R24 (> 1.000fach molarer Überschuss) untersucht (Spur 8). Die RNA R24 (Tab. 3.5) entstammte ebenfalls der Selektion p53-spezifischer Aptamere in der Arbeitsgruppe von Professor Ulrich Hahn (unveröffentlichte Daten). Diese RNA konnte keine Abschwächung der Aptamer-sIL-6R-Interaktion hervorrufen.



**Abb. 5.22: Gel-Shift-Analyse der spezifischen Interaktion zwischen Aptamer 16-3 und dem Zielmolekül sIL-6R mit dazugehörigen Kontrollen.** Neben der Interaktion des markierten Aptamers 16-3 (< 1 nM, Spuren 1 und 5) mit dem sIL-6R (75 nM, Spuren 2 und 6) wurden zusätzlich Kompetitionen zwischen markiertem und nicht markiertem Aptamer (Spuren 3 und 7) bzw. markiertem Aptamer und nicht markierter Kontroll-RNA R24 (Spur 8) untersucht. In Spur 4 ist die Bindung eines Anti-His-AK an sIL-6R-Aptamer-Komplexe gezeigt, in Spur 9 die Interaktion zwischen Aptamer und Anti-His-AK. Nach Inkubation und erfolgter Gelelektrophorese (5%iges, natives PAA-Gel; 4.6.2) konnten die Banden mittels Autoradiographie detektiert werden. Es sind die Gele zweier voneinander unabhängiger Assays zusammengefügt.

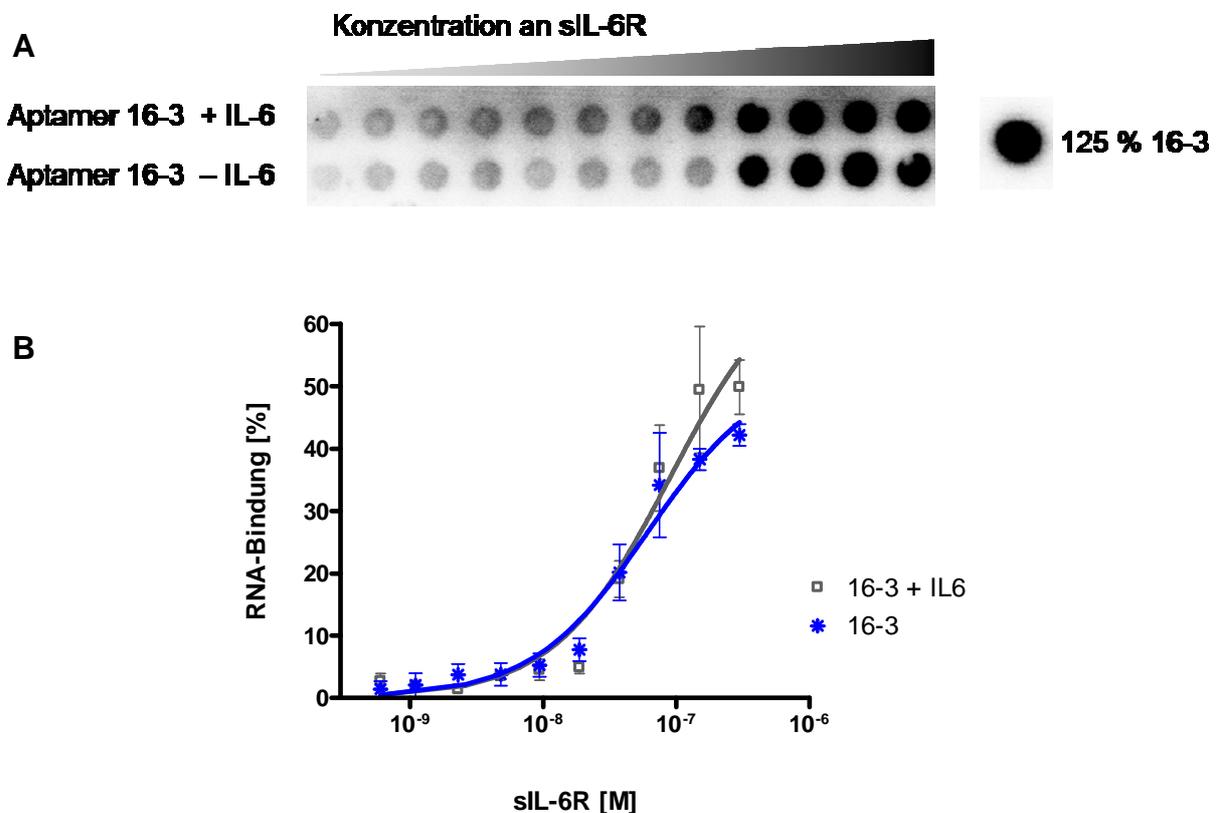
Zur Identifizierung des vom Aptamer gebundenen Proteins wurden des Weiteren Versuche mit einem spezifischen Anti-His-Antikörper durchgeführt. Da das Targetprotein sIL-6R einen His-Tag trug, konnte der Antikörper das Protein am His-Tag binden. Die Aptamer-Protein-Antikörper-Komplexe wurden im Gel durch einen *Supershift* deutlich, d. h. eine noch stärker verzögerte Bande im Vergleich zum Aptamer-Protein-Komplex (Spur 4). Der Anti-His-Antikörper zeigte keine Interaktion mit dem Aptamer 16-3 allein (Abb. 5.22, Spur 9).

## 5.5 Wettbewerbsstudien

Im Folgenden wurde in *in vitro* Wettbewerbsstudien die Wechselwirkung zwischen den selektierten RNA-Aptameren und dem sIL-6R in An- und Abwesenheit seiner natürlichen Liganden IL-6, gp130 und Hyper-IL-6 untersucht.

### 5.5.1 Wettbewerbsanalyse zwischen Aptamer 16-3 und Interleukin-6

Die Fähigkeit des Aptamers 16-3, mit dem natürlichen Liganden des sIL-6R, dem Interleukin-6, um eine Bindungsstelle kompetieren zu können, sollte in Filterbindungsstudien analysiert werden (Abb. 5.23).

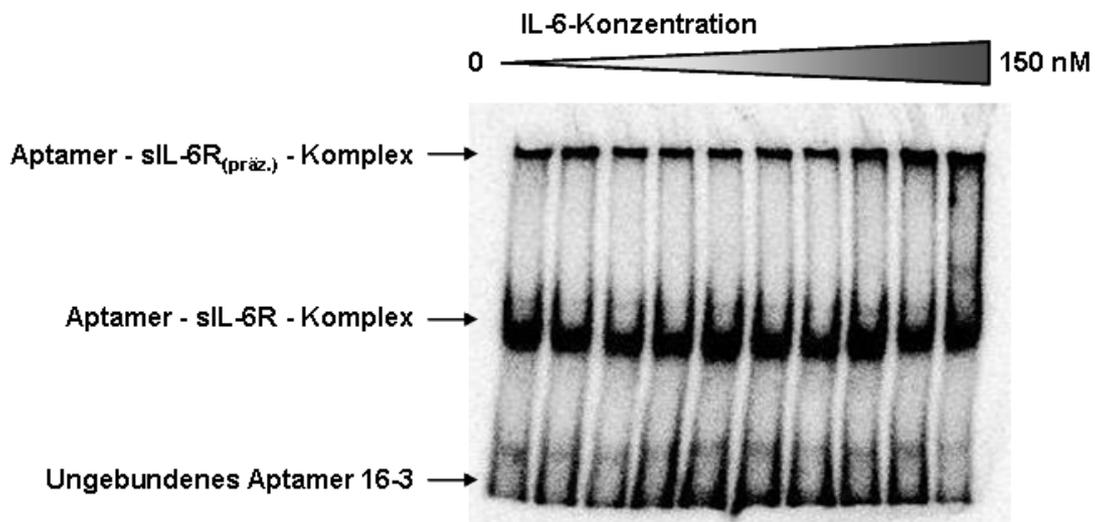


**Abb. 5.23: Filterbindungsstudie des RNA-Aptamers 16-3 an sIL-6R in An- bzw. Abwesenheit von IL-6.**  
**A:** Das Protein sIL-6R wurde in steigender Konzentration (0 – 300 nM) mit radioaktiv markiertem Aptamer 16-3 in Anwesenheit von 740 nM IL-6 (+IL-6) bzw. in Abwesenheit von IL-6 (-IL-6) inkubiert und filtriert (4.6.1). Die auf dem Filter verbliebenen Mengen der markierten RNA sind veranschaulicht. Zur Berechnung des prozentualen Anteils an gebundener RNA wurde jeweils eine definierte Menge (125 %) an RNA auf die Membran aufgetragen. **B:** Der Anteil des gebundenen RNA-Aptamers 16-3 (in %) bei definierten sIL-6R-Konzentrationen in Anwesenheit von 740 nM IL-6 (+IL-6) bzw. in Abwesenheit von IL-6 (-IL-6) wurde anhand von Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und graphisch dargestellt (logarithmische Auftragung). Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1). Es handelte sich hierbei um eine Doppelbestimmung.

## 5 ERGEBNISSE

In Filterbindungsstudien wurde die Wechselwirkung des sIL-6R mit dem Aptamer 16-3 in An- bzw. Abwesenheit des Liganden IL-6 untersucht (4.6.1). Zur Bestimmung der prozentualen RNA-Bindung wurde eine definierte Menge an Aptamer 16-3 (125 %) auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen (Abb. 5.23; A). Die Auswertung dieses Experiments zeigte, dass IL-6 auf die Interaktion zwischen dem Aptamer 16-3 und sIL-6R offensichtlich keinen Einfluss hatte (Abb. 5.23). Die Bestimmung der jeweiligen Dissoziationskonstanten resultierte in vergleichbaren Werten, d. h. der  $K_d$ -Wert ohne IL-6 wies eine Größe von etwa  $60 \pm 16$  nM auf, in Anwesenheit von IL-6 etwa  $89 \pm 28$  nM.

Die Bestätigung der Aussage, dass zwischen Aptamer 16-3 und IL-6 keine Konkurrenz stattfindet, sollte mit *Gel-Shift*-Assays erfolgen. Dazu wurde das Aptamer ( $< 1$  nM) mit dem sIL-6R (75 nM) inkubiert. Den Bindungsansätzen wurden steigende Mengen des Liganden IL-6 (0 – 150 nM) als Kompetitor zugesetzt. Die Trennung der Aptamer-Protein-Komplexe erfolgte im nativen PAA-Gel. Abbildung 5.24 zeigt deutlich, dass trotz steigender IL-6-Konzentrationen die deutliche Interaktion zwischen Aptamer und sIL-6R erhalten blieb, d. h. die in ihrem Laufverhalten verlangsamten Aptamer-sIL-6R-Komplexe wurden nicht gestört. Das Aptamer 16-3 und IL-6 wiesen somit nicht die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor auf.



**Abb. 5.24:** *Gel-Shift*-Assay zur Analyse einer möglichen Konkurrenz zwischen Aptamer 16-3 und IL-6 um die Bindung an sIL-6R. Der sIL-6R (75 nM) und das Aptamer 16-3 ( $< 1$  nM) wurden in Gegenwart steigender Konzentrationen an IL-6 (0 nM – 150 nM) auf eine Interaktion getestet. Die Trennung der Aptamer-Protein-Gemische erfolgte im 5%igen, nativen PAA-Gel (4.6.2). Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie.

In einem zweiten *Gel-Shift*-Experiment wurde die Konzentration an IL-6 auf  $1,5 \mu\text{M}$  erhöht. Auch diese hohe Konzentration an Ligand hatte keinen Einfluss auf die Aptamerbindung. Auf eine zusätzliche Abbildung wurde daher verzichtet.

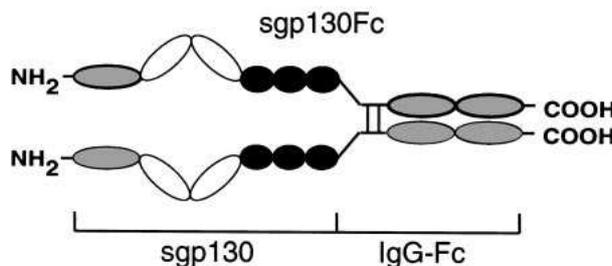
### 5.5.2 Interaktion des Aptamers 16-3 mit Hyper-IL-6 (H-IL-6) und sgp130Fc

Eine weitere Möglichkeit, eine Kompetition zwischen IL-6 und Aptamer nachzuweisen bzw. auszuschließen, lag in der Analyse der Interaktion zwischen Aptamer 16-3 und Hyper-IL-6 (Abb. 5.25). Hyper-IL-6 ist ein bioaktives Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, wobei beide Interaktionspartner über einen flexiblen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind. Dieser Linker setzt sich aus den 16 N-terminalen nicht-helikalen Aminosäuren des IL-6 und dreizehn weiteren Aminosäuren, vorwiegend Glycin und Serin, zusammen. Um die Größe dieses Fusionsproteins so gering wie möglich zu halten, wurde auf die N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne D1 und den C-Terminus des sIL-6R verzichtet, da beide nicht für die Bioaktivität des IL-6/sIL-6R-Komplexes benötigt werden [20]. Es resultiert ein 408 AS großes Fusionsprotein (Abb. 5.25) mit einem Molekulargewicht von etwa 57 kDa.



**Abb. 5.25: Das Fusionsprotein Hyper-IL-6.** Schematisch gezeigt ist das Hyper-IL-6-Fusionskonstrukt bestehend aus dem N- und C-terminal verkürzten sIL-6R (AS 113 - 323) und IL-6, welche über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind [20]. (Linker-Aminosäuren im Einbuchstaben-Code)

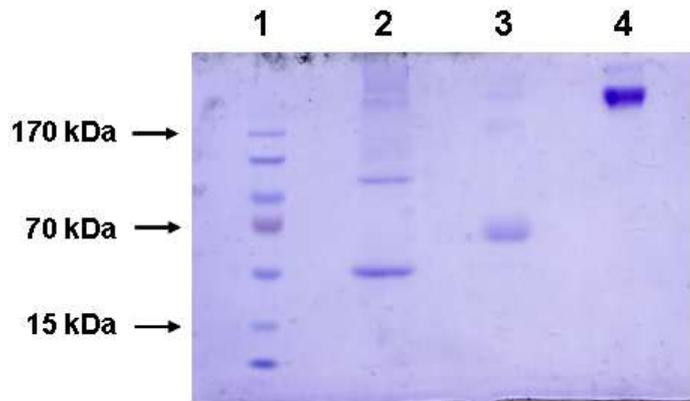
Des Weiteren sollte der Einfluss der Aptamerbindung auf die Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und sgp130Fc untersucht werden. Hyper-IL-6 als aktive Form des IL-6/sIL-6R-Komplexes bindet neben gp130 auch dessen alternativ gespleißte, lösliche Form sgp130. Durch genetische Fusion dieses Proteins mit dem konstanten Teil eines IgG1-Antikörpers wurde eine stark aktive Form dieser Rezeptoruntereinheit geschaffen: sgp130Fc [16, 72]. Diese monomere Form dimerisiert aufgrund des jeweiligen Fc-Teils (~ 189 kDa). In Abbildung 5.26 ist das Protein schematisch dargestellt.



**Abb. 5.26: Das Fusionsprotein sgp130Fc.** Die extrazelluläre Domäne des humanen gp130 (schwarz: FN-III-Domänen; grau: Immunglobulin-ähnliche Domänen, weiß: Zytokin-bindende Domänen) wurde mit der konstanten Region der schweren Kette des humanen IgG1 fusioniert (nach [72]). Zusätzlich ist ein C-terminaler Hexa-Histidin-Tag vorhanden. Durch den Fc-Teil wird eine Dimerisierung vermittelt.

## 5 ERGEBNISSE

Vor der Durchführung der Bindungsstudien an Hyper-IL-6 und sgp130Fc wurden die in der Arbeitsgruppe Rose-John (Universität Kiel, Deutschland) produzierten Proteine mittels SDS-PAGE (7,5%iges SDS-PAA-Gel; 4.3.1) kontrolliert (Abb. 5.27).



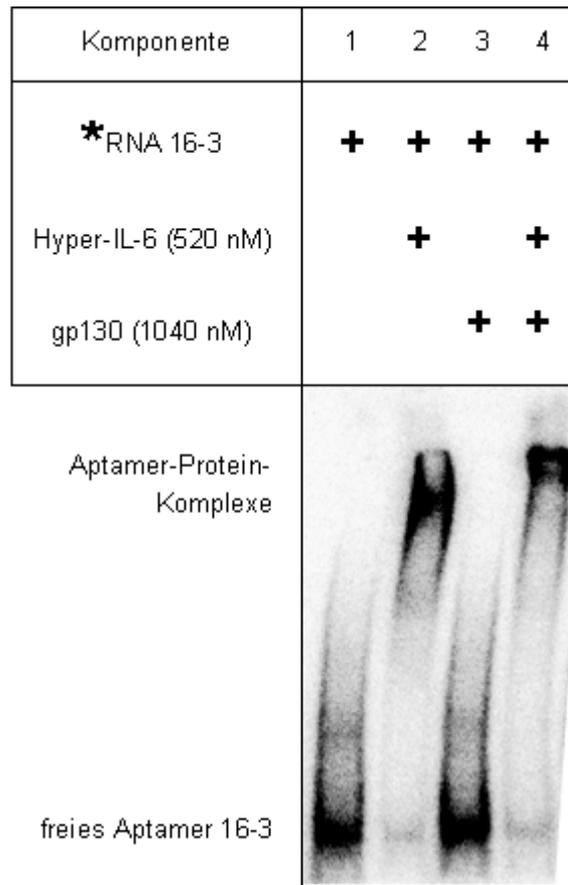
**Abb. 5.27:** 7,5%iges SDS-PAA-Gel zur Analyse der Proteine sIL-6R, Hyper-IL-6 und sgp130Fc. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Spur 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Spur 2: 2,6 µg sIL-6R (~ 50 kDa); Spur 3: 2,85 µg Hyper-IL-6 (~ 57 kDa); Spur 4: 2,3 µg sgp130Fc-Dimer (~ 189 kDa).

Alle drei Proteine: der sIL-6R (Spur 2), das Hyper-IL-6 (Spur 3) und das sgp130Fc (Spur 4) zeigten eine charakteristische Bande bei entsprechendem Molekulargewicht. Die Proteine wurden für Filterbindungsstudien und *Gel-Shift*-Analysen eingesetzt.

Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Aptamer nicht mit IL-6 um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor konkurriert. Ein *Gel-Shift*-Experiment (4.6.2) sollte folgend zur Untersuchung der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und dem Aptamer 16-3 dienen. Nach Inkubation von Hyper-IL-6 mit radioaktiv markiertem Aptamer und elektrophoretischer Trennung mittels nativer PAGE konnten die Banden mittels Autoradiographie detektiert werden (Abb. 5.28). Ein deutlich zu erkennender *Shift* ließ auf eine Interaktion schließen (Abb. 5.28; Spur 2). Damit wurde erneut bestätigt, dass das Aptamer 16-3 mit dem Rezeptor an einer von der IL-6-Bindestelle anderen Region interagiert.

In einem weiteren Reaktionsansatz wurde die Bindung des Aptamers an einen Komplex aus Hyper-IL-6 und sgp130Fc nachgewiesen (Abb. 5.28; Spur 4). Eine noch stärker in ihrem Laufverhalten verlangsamte Bande deutete auf eine Komplexbildung aller drei Interaktionspartner hin. Das Aptamer interagiert demnach mit Hyper-IL-6 an einer von der sgp130Fc-Bindestelle ungleichen Region. Das Aptamer interagiert nicht mit sgp130Fc allein (Abb. 5.28; Spur 3).

## 5 ERGEBNISSE



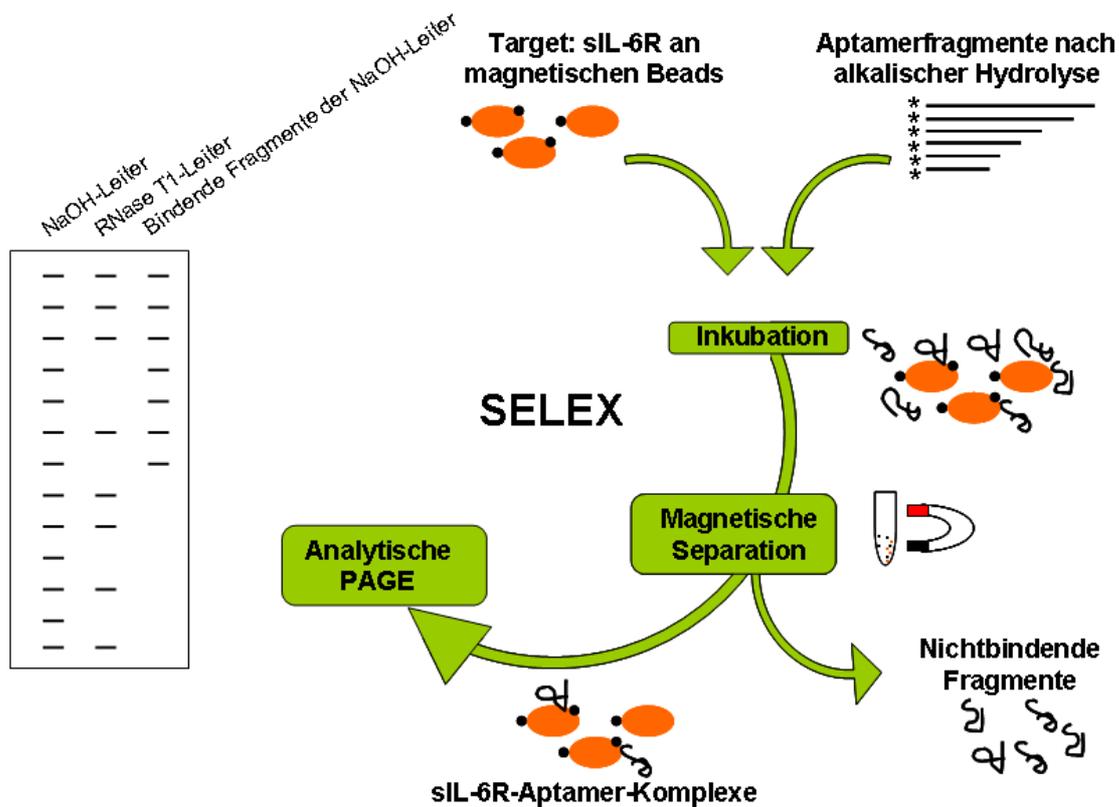
**Abb. 5.28:** *Gel-Shift-Studie zur Analyse der Interaktion zwischen Aptamer 16-3 und den Interaktionspartnern Hyper-IL-6 und sgp130Fc.* Hyper-IL-6 (Spur 2), sgp130Fc (Spur 3) und beide Proteine im Gemisch (Spur 4) wurden mit radioaktiv markiertem Aptamer 16-3 (< 1 nM) inkubiert. Nach erfolgter Gelelektrophorese (5%iges, natives PAA-Gel; 4.6.2) und Trocknen des Gels wurden die Banden mittels Autoradiographie detektiert.

In Filterbindungsstudien konnte eine zum sIL-6R vergleichbar affine Interaktion zwischen dem Aptamer 16-3 und Hyper-IL-6 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 5.6 Minimalmotivsuche der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere

### 5.6.1 „Damage Selection“

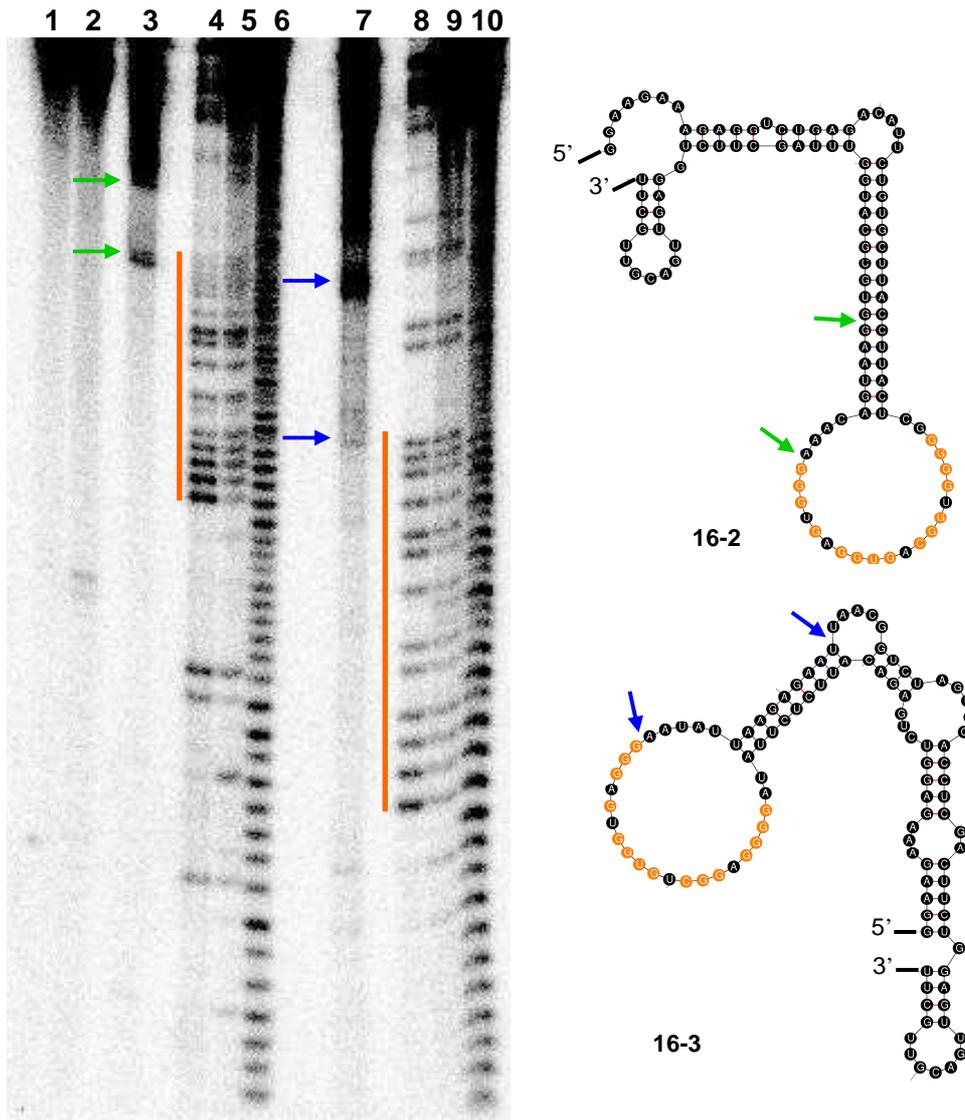
Die Identifikation eines minimierten Bindemotivs der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere erfolgte zunächst mittels der in Abbildung 5.29 schematisch dargestellten „Damage Selection“.



**Abb. 5.29:** Ablauf einer „Damage Selection“. Für die Minimalmotivsuche selektierter, sIL-6R-spezifischer RNA-Aptamere wurden durch partielle alkalische Hydrolyse von am 5'-Ende radioaktiv markiertem Aptamer (4.2.10) Fragmente jeder möglichen Länge erzeugt. Diese Spaltprodukte wurden analog der Aptamerselektion mit an Dynabeads<sup>®</sup>-immobilisiertem sIL-6R inkubiert. All die Fragmente, die nicht mehr an das Target banden, wurden mittels magnetischer Separation getrennt, bindende RNA-Moleküle eluiert und mittels eines 15%igen PAA-Sequenziergels (4.1.3) analysiert. Zur Kontrolle wurde die Aptamer-RNA einer RNase T1-Spaltung (4.2.12) unterzogen und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Detektion der Banden erfolgte autoradiographisch.

Zur Durchführung dieses Experimentes wurden exemplarisch die Aptamere 16-2 und 16-3 am 5'-Ende radioaktiv markiert (4.2.10). Nach alkalischer Hydrolyse wurden die resultierenden RNA-Fragmente auf eine Interaktion mit dem sIL-6R, immobilisiert an Dynabeads<sup>®</sup>, untersucht (4.6.3).

## 5 ERGEBNISSE



**Abb. 5.30:** „Damage Selection“ der Aptamere 16-2 und 16-3. **Links:** Zur Minimalmotivsuche wurden die am 5'-Ende radioaktiv markierten Aptamere 16-2 und 16-3 durch partielle alkalische Hydrolyse unspezifisch gespalten. Nach Inkubation mit an Dynabeads®-immobilisiertem sIL-6R wurden noch bindende RNA-Moleküle retardiert und mittels eines 15%igen PAA-Sequenziergels analysiert. Spur 1: unbehandeltes Aptamer 16-2, Spur 2: unbehandeltes Aptamer 16-3; Spur 3: Eluat nach *Damage Selection* von Aptamer 16-2, Spuren 4+5: Aptamer 16-2 nach Spaltung mit RNaseT1 (0,1 bzw. 1 U/μl), Spur 6: Aptamer 16-2 nach alkalischer Hydrolyse; Spur 7: Eluat nach *Damage Selection* von Aptamer 16-3, Spuren 8+9: Aptamer 16-3 nach Spaltung mit RNaseT1 (0,1 bzw. 1 U/μl), Spur 10: Aptamer 16-3 nach alkalischer Hydrolyse. Orange markiert ist jeweils der Bereich des G-reichen Konsensusmotivs. Die grünen und blauen Pfeile weisen auf kurze RNA-Fragmente hin, die zur Bindung an den Rezeptor befähigt waren. Diese Fragmente wurden anhand der Sequenz identifiziert (rechts). **Rechts:** Vorhergesagte Sekundärstruktur (4.6.4) der Aptamere 16-2 und 16-3. Konservierte Basen des Konsensusmotivs sind in orange dargestellt. Die Pfeile deuten auch hier auf die zur Bindung notwendige Aptamerlänge hin.

Noch bindende Fragmente der RNA-Aptamere 16-2 (Abb. 5.30, Spur 3) und 16-3 (Abb. 5.30, Spur 7) wurden über ein 15%iges PAA-Sequenziergel (4.1.3) analysiert. In der Abbildung 5.30 ist die Autoradiographie dieses Gels dargestellt.

Um eine Identifizierung und Zuordnung der entstandenen Banden zu ermöglichen, wurden Kontrollen benötigt. Als erster Kontrollansatz diente die entsprechende, unbehandelte RNA

## 5 ERGEBNISSE

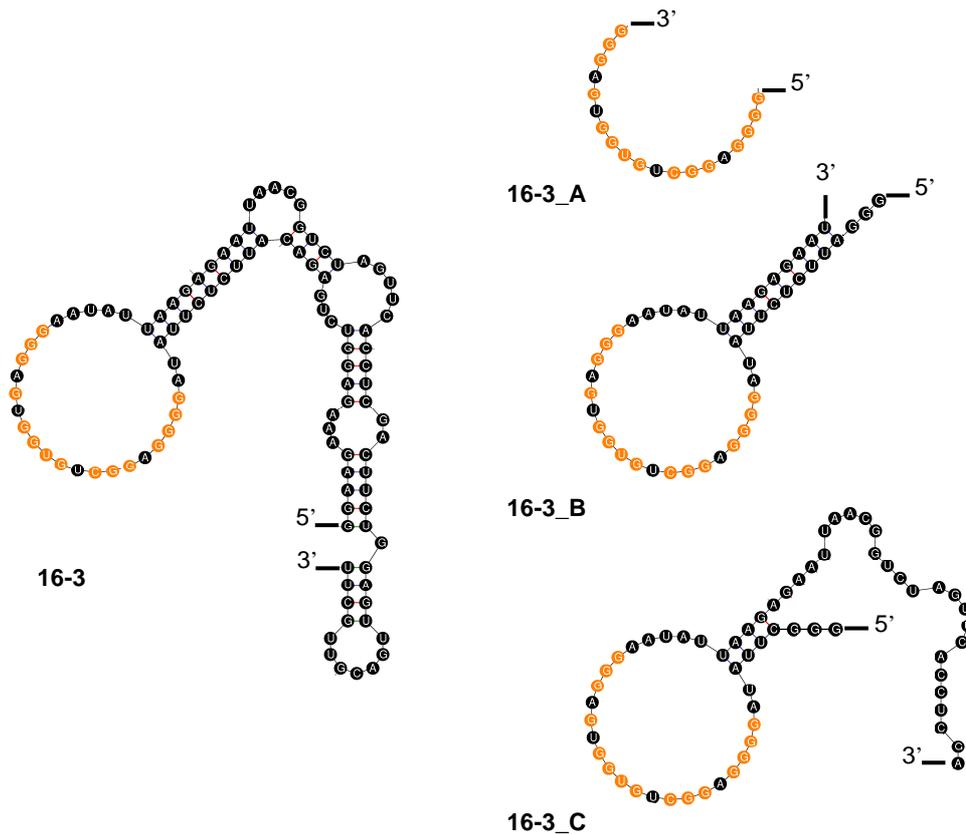
(Abb. 5.30, Spur 1: 16-2 und Spur 2: 16-3). Weiterhin wurde eine Nukleotidleiter der RNA erzeugt, wobei die RNA im alkalischen Milieu unspezifisch hydrolysiert wurde (Spuren 6 und 10). Zur weiteren Kontrolle wurde die markierte RNA einer Ribonuklease T1-Spaltung unterzogen (4.2.12), wobei die Phosphodiesterbindungen zwischen dem jeweiligen 3'-Guanosin und 5'-OH-Rest gespalten wurden. Somit konnten wichtige Guaninreste, besonders die des G-reichen Konsensusmotivs der Aptamere, den Banden im Gel zugeordnet werden (Spuren 4 und 5 für das Aptamer 16-2, Spuren 8 und 9 für das Aptamer 16-3).

Nach Identifikation der entstandenen Fragmente ließ sich erkennen, dass sowohl die sIL-6R-Bindung des Aptamers 16-2 (Abb. 5.30, Spur 3) als auch des Aptamers 16-3 (Abb. 5.30, Spur 7) das Vorhandensein des Konsensusmotivs (in Abb. 5.30 orange markiert) erforderte (Abb. 5.30, links, untere Pfeile). Ein Vergleich mit der jeweiligen prognostizierten Sekundärstruktur (Abb. 5.30, rechts) bestätigte diese Aussage. In beiden Ansätzen der *Damage Selection* (Spuren 3 und 7) fällt zusätzlich die nächst höhere Bande auf (Abb. 5.30, links, obere Pfeile). Bei diesen etwas längeren, bindenden Spezies handelte es sich möglicherweise um Fragmente, bei denen das Konsensusmotiv noch durch einen Teil des doppelsträngigen Stammes stabilisiert vorlag. Die Pfeile in der Abb. 5.30 (rechts) kennzeichnen jeweils am weitesten verkürzten RNA-Fragmente, die noch zur Bindung an den sIL-6R befähigt sind.

Die Experimente der *Damage Selection* wurden analog auch an 3'-radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Leider konnten daraus keine weiteren Informationen gewonnen werden, da keine definierten Banden sondern lediglich verschwommene Signale erhalten wurden.

### 5.6.2 Verkürzung der Aptamere anhand von Sekundärstrukturvorhersagen

Basierend auf der Sekundärstrukturvorhersage des Aptamers 16-3 mit Hilfe des Programms *mfold web server* (Abb. 5.12; 4.6.4) unter der Einschränkung, dass die Nukleobasen der konservierten Region (Abb. 5.12, orange) keine Paarungen eingehen dürfen, wurde die Sequenz des Aptamers 16-3 verkürzt (4.6.5). Dabei wurde angenommen, dass der G-reiche, konservierte Bereich möglicherweise eine stabile Tertiärstruktur in Form von G-Quartetten bzw. G-Quadruplexen ausbildet, welche für die Bindung des Aptamers an sIL-6R von Bedeutung sein könnten. Zunächst wurde das Aptamer 16-3 zu einem 19mer (16-3\_A) empirisch verkürzt, welches nur die konservierte, G-reiche Region des Aptamers behielt. Die verkürzte RNA 16-3\_B (47 nt) beinhaltete zusätzlich zur G-reichen Region den stabilisierenden, doppelsträngigen Bereich bestehend aus neun Basenpaaren. Die dritte verkürzte RNA, das 63mer 16-3\_C, war durch das Fehlen der konstanten Primerbereiche der ursprünglichen Sequenz charakterisiert (Abb. 5.31).



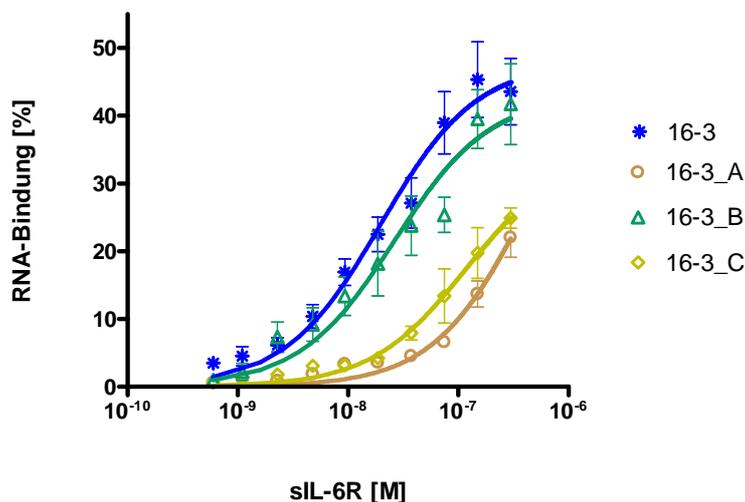
| Aptamer [nt] | Sequenz   |
|--------------|---|
| 16-3_A [19]  | GGGGAGGCUGUGGUGAGGG   |
| 16-3_B [47]  | GGGAUUCUCUUAUAUAGGGGAGGCUGUGGUGAGGGAAUAUUAAGAGAAU                 |
| 16-3_C [63]  | GGGCUUAUAUAGGGGAGGCUGUGGUGAGGGAAUAUUAAGAGAAUUAACGGUCUAGUUCACCUCGA |

**Abb. 5.31: Verkürzung des Aptamers 16-3 anhand der vorhergesagten Sekundärstruktur unter Verwendung des Programms *mfold web server* [81]. Oben:** Gezeigt sind neben der Sekundärstruktur des Wildtyp-Aptamers 16-3 die darauf basierend verkürzten Varianten 16-3\_A, 16-3\_B und 16-3\_C. Der Bereich konservierter Basen, der in allen verkürzten RNAs erhalten blieb, ist orange gekennzeichnet. **Unten:** RNA-Sequenzen der verkürzten Varianten des sIL-6R-spezifischen Aptamers 16-3 in 5'-3'-Richtung.

Zur Analyse der Bindungseigenschaften dieser verkürzten RNA-Moleküle wurden Filterbindungsstudien durchgeführt (4.6.1, Abb. 5.32). Für die Variante 16-3\_B konnte ein  $K_d$ -Wert von etwa 26,4 nM (Tab. 5.7) ermittelt werden. Diese deutliche Verkürzung hatte keinen Einfluss auf die Affinität zum Rezeptor. Sogar die auf die G-reiche Region reduzierte Variante 16-3\_A, welche lediglich aus 19 Nukleotiden bestand, konnte das Protein binden, jedoch mit stark reduzierter Bindungsaffinität ( $K_d \sim 446$  nM) im Vergleich zu 16-3. Auch das Fehlen der Primerregionen in 16-3\_C schwächte die Affinität zum Zielprotein ( $K_d \sim 117$  nM) ab.

## 5 ERGEBNISSE

Hierbei sollten die angegebenen Werte für die Aptamervarianten 16-3\_A und 16-3\_C jedoch als Richtwerte gesehen werden, da der zur genauen  $K_d$ -Bestimmung notwendige Sättigungsbereich der RNA-Protein-Interaktion bei einer maximalen sIL-6R-Konzentration von 300 nM nicht vollständig erreicht werden konnte.



**Abb. 5.32: Bindung des Aptamers 16-3 und verkürzter Varianten an sIL-6R.** Der Anteil an gebundener RNA (in %) bei definierten sIL-6R-Konzentrationen wurde in Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt und in Abhängigkeit zur sIL-6R-Konzentration dargestellt (logarithmische Auftragung). Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Studien dar. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells (4.6.1).

Wie anhand der Abbildung 5.32 ersichtlich wird, zeigten alle verkürzten RNAs eine Bindung an das Zielmolekül sIL-6R. Trotz einer Verkürzung um 59 Nukleotide lag die Affinität des 47mers 16-3\_B im Bereich des Wildtyp-Aptamers. Darauf basierend wurde diese Variante für weitere Experimente zur Charakterisierung der Aptamer-sIL-6R-Wechselwirkung gewählt.

**Tab. 5.7:  $K_d$ -Werte und Anteile maximaler Bindung ( $B_{max}$ ) des Aptamers 16-3 und verkürzter Varianten an sIL-6R ermittelt in Filterbindungsstudien.**

| Aptamer | $K_d$ [nM]     | Anteil maximaler Bindung [%] |
|---------|----------------|------------------------------|
| 16-3    | $19,7 \pm 4,2$ | $47,9 \pm 2,8$               |
| 16-3_A  | $446 \pm 200$  | $54,4 \pm 16,4$              |
| 16-3_B  | $26,4 \pm 7,1$ | $43,1 \pm 3,4$               |
| 16-3_C  | $117 \pm 30$   | $34,7 \pm 4,0$               |

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen berechnet.

## 5.7 Mutationanalysen des Aptamers 16-3\_B

Auffällig für das Konsensusmotiv der Aptamere war ein verstärktes Vorkommen von Guaninbasen. Dies führte zu der Hypothese, dass die RNA-Moleküle stabilisierende G-Quadruplex-Strukturen ausbilden konnten, was im Folgenden näher untersucht werden sollte. Einen möglichen Hinweis auf eine Quadruplexformation könnten Mutationsstudien liefern, wobei wichtige, eventuell am G-Quartett beteiligte Guaninbasen durch Uracil ersetzt wurden. Innerhalb des Konsensusmotivs der selektierten RNA-Aptamere existierten fünf potentielle GG-Paare. Sofern die G-reiche Region tatsächlich zur Ausbildung von G-Quartetten befähigt wäre, dürften folglich vier der fünf G-Dupletten für die Bindung unentbehrlich sein.

Ausgehend vom 47mer 16-3\_B (Abb. 5.33, 16-3\_B), das neben der konservierten G-reichen Region durch einen stabilisierenden, doppelsträngigen Stamm charakterisiert war (Abb. 5.31), wurden im Bereich der konservierten Region Mutationen eingefügt. Die Guaninreste an den Positionen 15, 17, 21, 27 und 32. wurden jeweils durch Uracilreste ersetzt und somit fünf verschiedene Mutanten erzeugt (Abb. 5.33, 16-3\_B\_M1 - 16-3\_B\_M5).

16-3\_B: 5' -GGGAUUCUCUUAUAG<sub>15</sub>GGGAGGCUGUGGUGAGGG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

16-3\_B\_M1: 5' -GGGAUUCUCUUAUAU<sub>15</sub>GGGAGGCUGUGGUGAGGG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

16-3\_B\_M2: 5' -GGGAUUCUCUUAUAG<sub>15</sub>GUGAGGCUGUGGUGAGGG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

16-3\_B\_M3: 5' -GGGAUUCUCUUAUAG<sub>15</sub>GGGAGUCUGUGGUGAGGG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

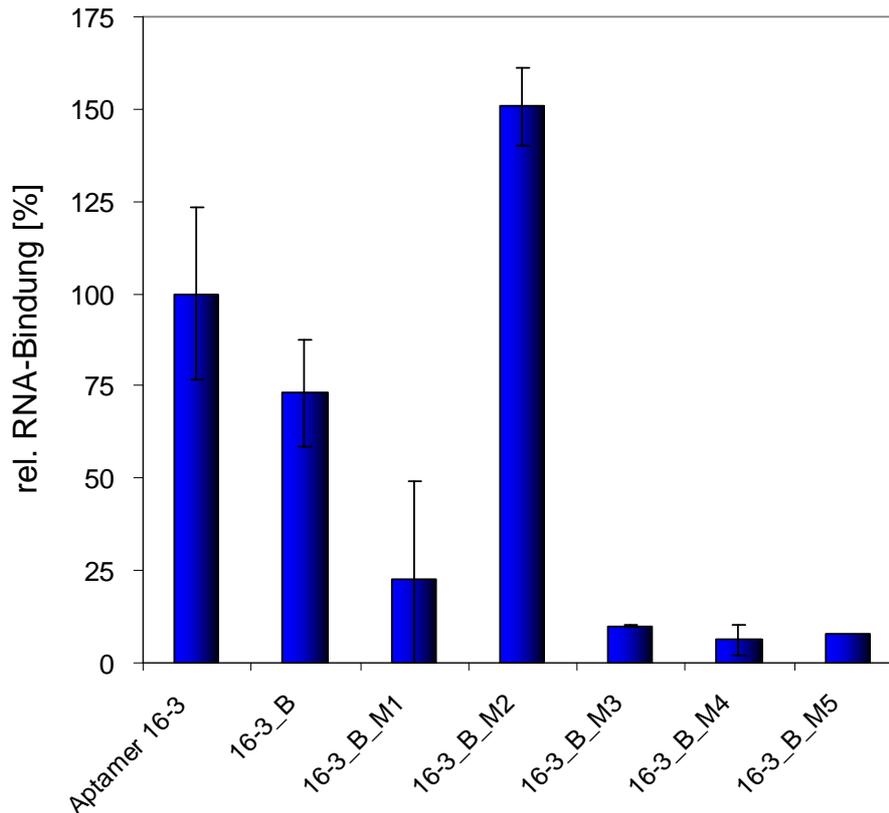
16-3\_B\_M4: 5' -GGGAUUCUCUUAUAG<sub>15</sub>GGGAGGCUGUGUUGAGGG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

16-3\_B\_M5: 5' -GGGAUUCUCUUAUAG<sub>15</sub>GGGAGGCUGUGGUGAGUG<sub>33</sub>AAUAUUAAGAGAAU-3'

**Abb. 5.33: Sequenzen des verkürzten sIL-6R-spezifischen Aptamers 16-3\_B und mutierte Varianten.** Ein möglicher Hinweis auf die Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen konnte durch Mutationsstudien erhalten werden. Ausgehend von der sIL-6R-bindenden Variante 16-3\_B wurden innerhalb der Konsensussequenz (in 16\_3\_B orange markiert) am G-Quartett möglicherweise beteiligte Guaninreste durch Uracilreste (blau) ersetzt. Die Mutation des G an Position 15 charakterisiert die Variante 16-3\_B\_M1. Um die anderen vier GG-Paare auszuschalten, wurden zusätzliche Varianten erzeugt: 16-3\_B\_M2 – 16-3\_B\_M5. Tiefgestellte Zahlen nummerieren beispielhaft die Position der einzelnen Basen.

Eine Mutation innerhalb der an der Quadruplex-Formation beteiligten GG-Paare sollte zum Verlust der Bindung an das Protein Hyper-IL-6 führen. Die Mutationsanalysen erfolgten in Form von Filterbindungsstudien (4.6.1). Die Bindung der verkürzten Varianten wurde jeweils mit dem bindenden Anteil des Aptamers 16-3 verglichen. Die Auswertung der Analyse ist der Abb. 5.34 zu entnehmen.

## 5 ERGEBNISSE



**Abb. 5.34: Mutationsanalyse zur Bindung der Aptamere 16-3, 16-3\_B und der fünf Varianten an Hyper-IL-6.** Der Anteil relativer RNA-Bindung (in %) wurde bei einer definierten sIL-6R-Konzentration von 300 nM mit Hilfe von Filterbindungsstudien (4.6.1) ermittelt. Die gezeigten Messpunkte und Fehlerbalken stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei voneinander unabhängigen Studien dar. Die relative Bindung des Aptamers 16-3\_B und der Varianten bezieht sich auf die Bindung des Wildtyp-Aptamers 16-3.

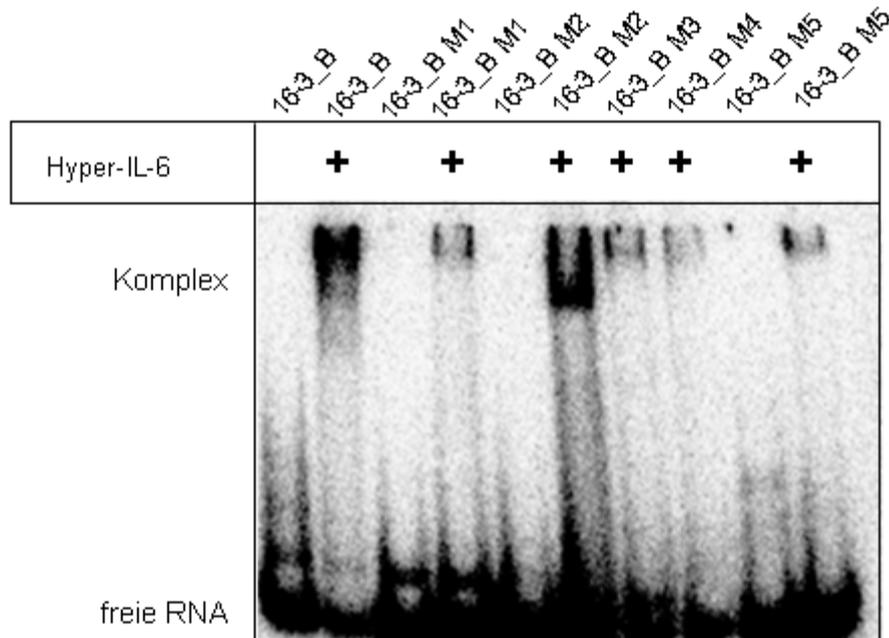
Die Aptamere 16-3 und 16-3\_B ähnelten einander in ihrem starken Bindungsverhalten gegenüber Hyper-IL-6. Im Vergleich dazu führte der Austausch definierter Guaninreste innerhalb der drei Mutanten 16-3\_B\_M3, M4 und M5 zu einem Funktionsverlust. Die Fähigkeit, mit Hyper-IL-6 zu interagieren, war deutlich reduziert. Die Mutante 16-3\_B\_M1 war durch eine stark verringerte Bindung charakterisiert. 16-3\_B\_M2 dagegen schien unbeeinflusst von dem Basenaustausch zu sein und zeigte eine vergleichbare oder gar bessere Bindung an Hyper-IL-6.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen stehen im Einklang mit der aufgestellten Hypothese zur möglichen Ausbildung einer G-Quadruplex-Struktur. Der Funktionsverlust der vier Mutanten 16-3\_B\_M1, M3, M4 und M5 führt zu der Aussage, dass die Guaninreste 15, 21, 27 und 32 des Aptamers 16-3\_B für die Aptamerbindung essentiell und vielleicht in die Ausbildung von G-Quartetten involviert sind.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses erfolgte die Analyse der Interaktionen zwischen Hyper-IL-6 und den Aptamer-Varianten in einem *Gel-Shift*-Assay (Abb. 5.35; 4.6.2). Auch dieses Experiment zeigte, dass das Aptamer 16-3\_B und die Mutante 16-3\_B\_M2 deutlich mit

## 5 ERGEBNISSE

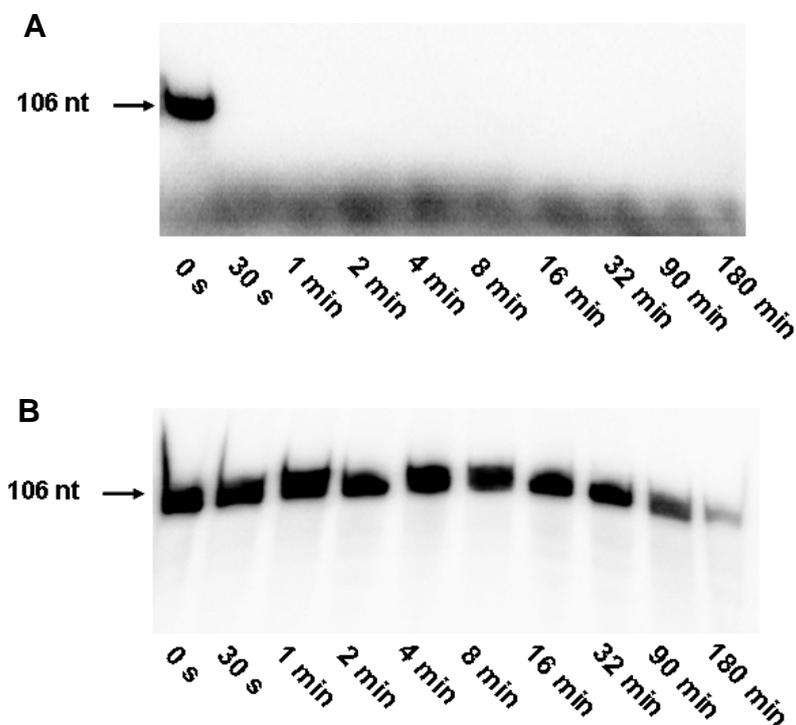
Hyper-IL-6 interagieren konnten. So führte eine Mutation des Guanins an Position 17 nicht zu einem Funktionsverlust des Aptamers. Die anderen vier Mutanten zeigten im Vergleich dazu eine deutlich reduzierte Interaktionsfähigkeit.



**Abb. 5.35:** *Gel-Shift-Assay* zur Analyse von Varianten des Aptamers 16-3\_B. Die Analyse der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 (330 nM) und dem Aptamer 16-3\_B bzw. dessen Varianten (16-3\_B\_M1 – 16-3\_B\_M5) erfolgte mittels nativer PAGE (5%iges PAA-Gel; 4.6.2). Die Detektion der Banden erfolgte mittels Autoradiographie.

### 5.8 Stabilität der RNA-Aptamere in Zellkulturmedium

Um eine biologische Aktivität des Aptamers 16-3 im Zellkulturmodell testen zu können, wurde vorab die Stabilität des Aptamers 16-3 in DMEM-Medium, dem FKS zugegeben wurde, kontrolliert. Das radioaktiv markierte Aptamer 16-3 wurde in diesem Medium für verschiedene Zeitspannen bei 37 °C inkubiert und anschließend über ein 10%iges, denaturierendes PAA-Gel (4.1.2) analysiert. Abbildung 5.36 zeigt das dazugehörige Autoradiogramm.



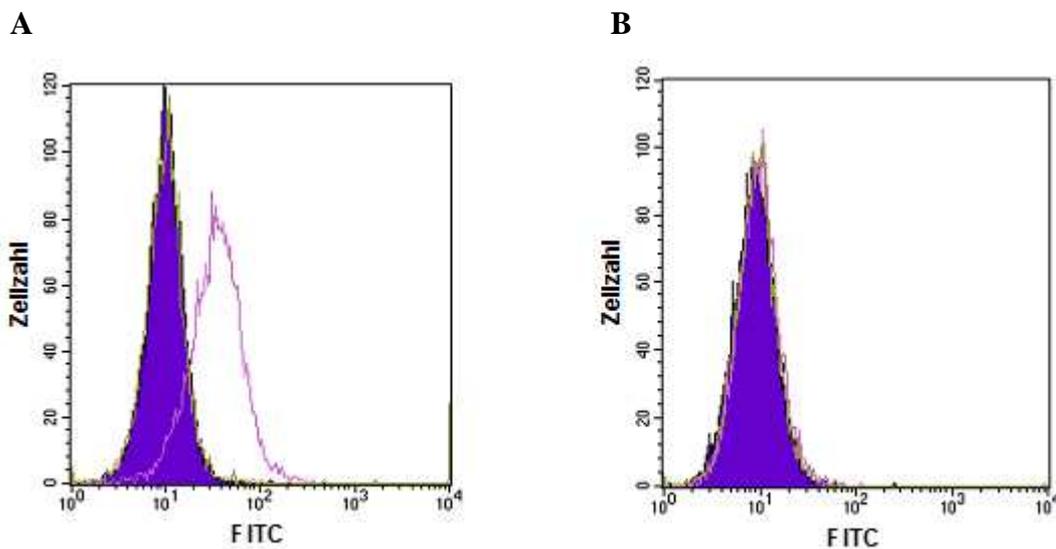
**Abb. 5.36: Stabilität des RNA-Aptamers 16-3 in Zellkulturmedium.** 10 pmol radioaktiv markiertes Aptamer 16-3 wurden in 100  $\mu$ l DMEM mit FKS (A) bzw. ohne FKS (B) aufgenommen und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 10  $\mu$ l Aliquots entnommen, 2x RNA-Ladepuffer zugegeben und direkt bei -20 °C tiefgefroren. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels denaturierender PAGE (10%iges PAA-Gel; 4.1.2). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie detektiert.

Es zeigte sich, dass die Stabilität des RNA-Aptamers 16-3 in FKS-enthaltendem Zellkulturmedium sehr gering war (Abb. 5.36). Bereits nach 30 s war die RNA vollständig abgebaut (Abb. 5.36, A). In Medium ohne FKS war die RNA deutlich länger stabil (Abb. 5.36, B).

Für Analysen mittels Durchflusszytometrie war es daher von großer Bedeutung, die Zellen vor Inkubation mit den RNA-Aptameren durch gründliches Waschen mit 1x Selektionspuffer B oder FKS-freiem Zellkulturmedium von RNasen zu befreien.

### 5.9 Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen

Um die Fragestellung einer Bindung der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere an IL-6R-tragende Zellen beantworten zu können, musste zunächst die Expression des IL-6R auf der Oberfläche eines geeigneten Zellkultursystems nachgewiesen werden. Bei den dafür gewählten eukaryotischen Zellen handelt es sich um die Zelllinie BAF/3 (3.12). Diese BAF/3-Zellen waren mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. den cDNAs für gp130, TNF und IL-6R (BAF/gp130/IL6R/TNF) stabil transfiziert worden. Mittels Durchflusszytometrie sollte die Bindung eines IL-6R-spezifischen Antikörpers (3.10) auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen (Abb. 5.37, A) nachgewiesen werden (4.8.1).

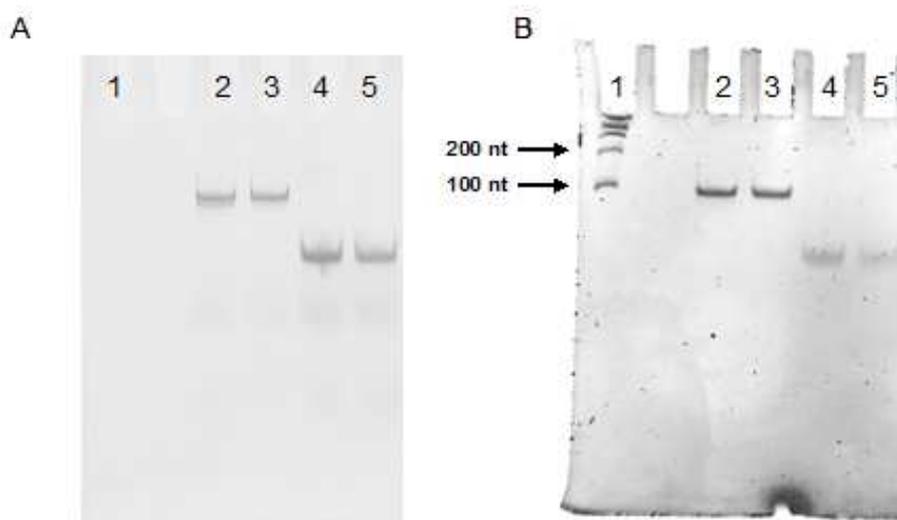


**Abb. 5.37: Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen mittels Durchflusszytometrie (4.8).** A) Gezeigt ist die Analyse von 10.000 unmarkierten BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen (blaues Integral; ■) am Durchflusszytometer. Die Bindung des primären hIL-6R-AK (3.10) gefolgt von dem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK führten, wie erwartet, zu einer Verschiebung der vermessenen Fluoreszenzintensitäten (■), da diese Zellen zur Produktion des IL-6R befähigt waren. Zur Kontrolle einer spezifischen Wechselwirkung mit dem hIL-6R-AK wurden BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen vermessen, die lediglich mit dem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK inkubiert worden waren (■). B) Nach Analyse von 10.000 unmarkierten BAF/gp130-Zellen (blaues Integral; ■) wurden BAF/gp130-Zellen vermessen, die sowohl mit dem primären hIL-6R-AK (3.10) als auch dem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK inkubiert worden waren (■). Es ließ sich, wie erwartet, keine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachten, da diese Zellen nicht zur IL-6R-Produktion befähigt waren. Zur weiteren Kontrolle wurden BAF/gp130-Zellen nach der alleinigen Inkubation mit dem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK vermessen (■). Die Abbildungen stellen die Auftragung der vermessenen Zellzahl (Ordinate) gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten (Abszisse) dar (4.8.1).

Wie erwartet, ließ sich ausschließlich nach Bindung beider Antikörper, d. h. sowohl des primären hIL-6R-AK (3.10) als auch des sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK, an die BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen, ein deutlicher Fluoreszenz-*Shift* beobachten (Abb. 5.37; A, ■). Dieses Signal blieb bei Analyse der BAF/gp130-Zellen, welche nicht zur IL-6R-Produktion befähigt waren, aus (Abb. 5.37; B, ■).

### 5.10 Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an IL-6R-tragende Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollte geklärt werden, ob die beiden sIL-6R-spezifischen Aptamere 16-3 und 16-3\_B den nativen IL-6R auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen erkennen können. Um sich des Verfahrens der Durchflusszytometrie bedienen zu können, wurden neben den zu testenden Aptameren 16-3 und 16-3\_B zur Kontrolle einer unspezifischen Bindung auch der unselektierte RNA-Pool R1 und die Variante 16-3\_B\_M5 mit dem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markiert (4.2.9; 3.7). Der Erfolg der Fluoreszenzmarkierung wurde durch Trennung der RNAs mittels eines 10%igen, denaturierenden PAA-Gels am Fluoreszenzimager (Abb. 5.38, A; 4.1.6) und folgend nach EtBr-Färbung unter UV-Licht kontrolliert (Abb. 5.38, B; 4.1.4).



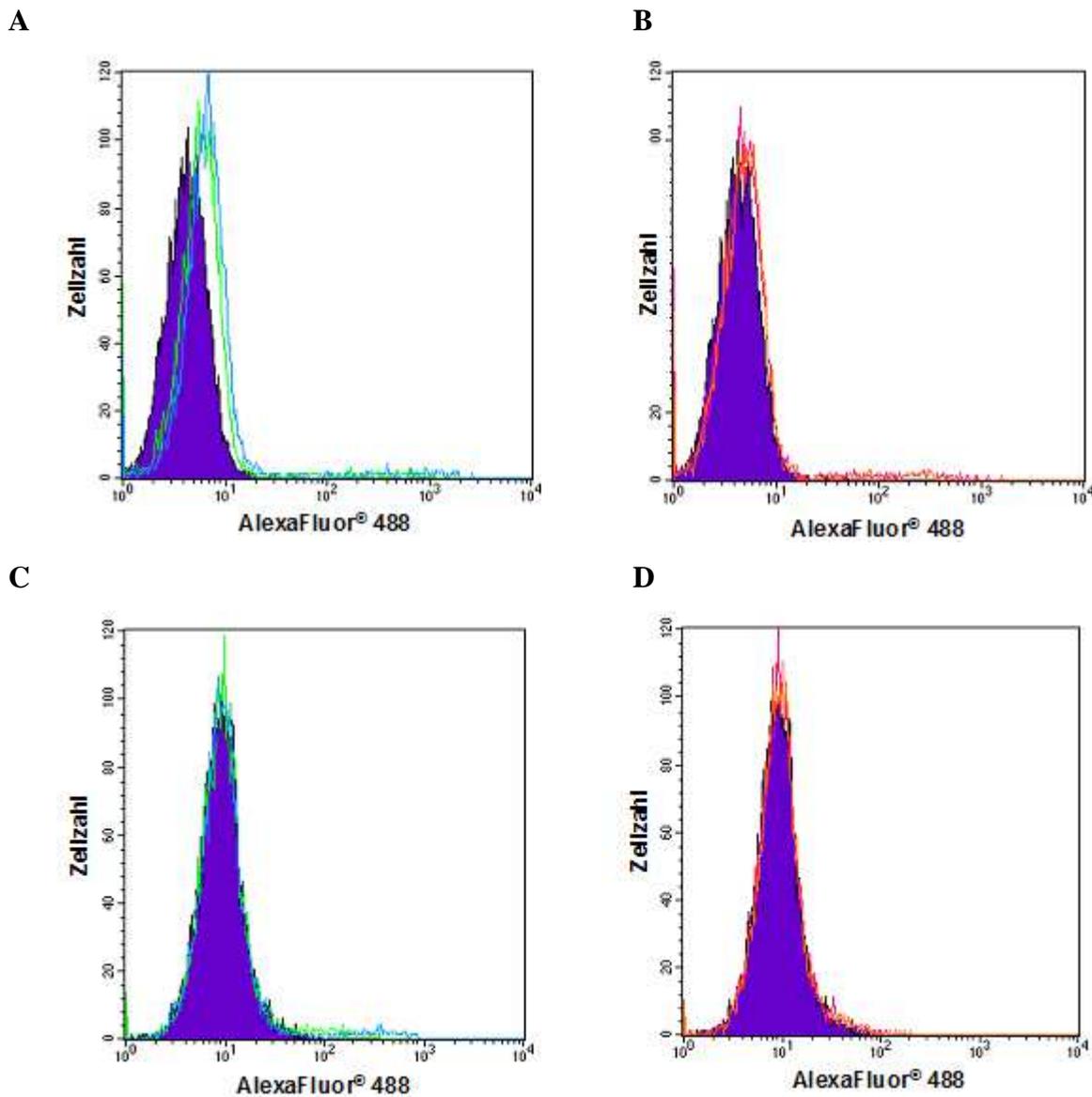
**Abb. 5.38: Kontrolle der Fluoreszenzmarkierung von RNA.** A) Jeweils 10 pmol der fluoreszenzmarkierten RNAs wurden auf ein 10%iges, denaturierendes PAA-Gel aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese am Fluoreszenzimager visualisiert (4.1.6). Spur 2: Aptamer 16-3 (106 nt); Spur 3: RNA-Pool R1 (106 nt), Spur 4: 16-3\_B (47 nt) und Spur 5: 16-3\_B\_M5 (47 nt) B) Einer Detektion der RNAs am Fluoreszenzimager folgend wurden die Nukleinsäuren des selben Gels mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert (4.1.4). Als Standard diente der *RiboRuler<sup>TM</sup> Low Range RNA Ladder* (Spur 1).

Anhand der Abb. 5.38 (A) wurde der Erfolg der RNA-Markierung mit AlexaFluor<sup>®</sup> 488 verdeutlicht. So konnte sowohl für die 106 nt-langen RNAs 16-3 und Pool R1 (Spur 2 und 3) als auch für die 47mere 16-3\_B und 16-3\_B\_M5 (Spur 4 und 5) ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Durch einen Vergleich mit dem *RiboRuler<sup>TM</sup> Low Range RNA Ladder* (Abb. 5.38; B) konnten die RNA-Banden eindeutig identifiziert und Degradationen ausgeschlossen werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob die sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere an IL-6R-tragende Zellen binden konnten, wurde erneut das Verfahren der Durchflusszytometrie genutzt (4.8).

Die beiden Zelllinien BAF/gp130 und BAF/gp130/IL6R/TNF wurden auf eine Interaktion mit den vier markierten RNAs hin untersucht (Abb. 5.39; 4.8.2).

## 5 ERGEBNISSE



**Abb. 5.39: Nachweis der Aptamerbindung an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen mittels Durchflusszytometrie (4.8).** **A)** Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten von 10.000 unmarkierten BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen (blaues Integral; ■) wurde die Bindung verschiedener RNAs an die BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen untersucht (4.8.2). Für die AlexaFluor® 488-markierten RNA-Aptamere 16-3 (—) und 16-3\_B (—) konnte eine Bindung an die IL-6R-tragenden BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen beobachtet werden, da es zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität kam. **B)** Die Kontroll-RNAs Pool R1 (—) und 16-3\_B\_M5 (—) zeigten keine Bindung an die BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen. **C)** Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten unmarkierter BAF/gp130-Zellen (blaues Integral; ■) wurde die Bindung der mit AlexaFluor® 488 markierten RNA-Aptamere 16-3 (—) und 16-3\_B (—) an die BAF/gp130-Zellen untersucht. Es konnte keine unspezifische Bindung an diese IL-6R-defizienten Zellen beobachtet werden, da sich keine Verschiebung der Fluoreszenzintensität zeigte. **D)** Die zur Kontrolle getesteten RNAs Pool R1 (—) und 16-3\_B\_M5 (—) zeigten ebenfalls keine unspezifische Bindung an BAF/gp130-Zellen. Die Abbildungen stellen eine Auftragung der vermessenen Zellzahl gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten dar (4.8).

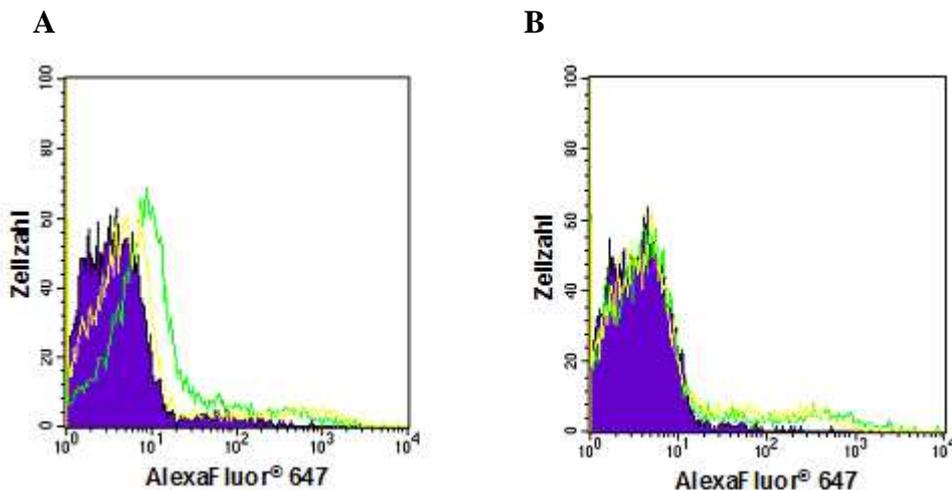
Anhand Abb. 5.39 ist zu erkennen, dass für die Aptamere 16-3 (—) und 16-3\_B (—) eine Interaktion mit den BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen nachgewiesen werden konnte, nicht aber für die Kontroll-RNAs Pool R1 (—) und die Mutante 16-3\_B\_M5 (—).

## 5 ERGEBNISSE

Dass die Aptamere ausschließlich an die Oberfläche der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen binden konnten, wurde am Durchflusszytometer durch Vermessen der IL-6R-defizienten BAF/gp130-Zellen bestätigt. Wie erwartet, zeigte keine der markierten Nukleinsäuren eine unspezifische Bindung an BAF/gp130-Zellen (Abb. 5.39, C und D).

### 5.11 Konkurrenz zwischen Aptamer 16-3 und dem Anti-hIL-6R-AK

Die folgenden Studien der Durchflusszytometrie sollten zur Analyse der Aptamerbindung an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen dienen, welche zuvor mit dem spezifischen murinen Anti-hIL-6R-AK und dem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-AK inkubiert worden waren (4.8). Zunächst wurde die Bindung des AlexaFluor® 647-markierten Aptamers 16-3 an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen gemessen (Abb. 5.40, A; ■). Eine unspezifische Interaktion mit den IL-6R-defizienten BAF/gp130-Zellen (Abb. 5.40, B; ■) blieb erwarteter Weise aus.



**Abb. 5.40: Aptamer-Antikörper-Kompetition.** Untersuchung der Bindung des sIL-6R-spezifischen Aptamers 16-3 an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen nach Inkubation mit einem hIL-6R-spezifischen AK (4.8). **A)** Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten von 10.000 unmarkierten BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen (blaues Integral; ■) am Durchflusszytometer wurde die Bindung des AlexaFluor® 647-markierten Aptamers 16-3 (■) an BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nachgewiesen und bestätigt. Ein deutlicher Shift der Zellen zu höheren Fluoreszenzsignalen konnte beobachtet werden. Eine vorherige Inkubation der Zellen mit dem hIL-6R-spezifischen, murinen AK blockierte die Bindung des Aptamers an die Zellen (■). Ein Fluoreszenzshift blieb aus. **B)** Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten unmarkierter BAF/gp130-Zellen (blaues Integral; ■) wurde eine unspezifische Bindung des AlexaFluor® 647-markiertem Aptamers 16-3 (■) an BAF/gp130-Zellen erneut ausgeschlossen. Zellen, die vorher mit dem hIL-6R-spezifischen, murinen AK inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine unspezifische Interaktion mit dem Aptamer (■). Die Abbildungen stellen eine Auftragung der vermessenen Zellzahl gegen die dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten dar.

Der Anti-hIL-6R-Antikörper in Kombination mit dem sekundären Ziege-anti-Maus-AK blockierte die spezifische Wechselwirkung des Aptamers mit den BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen (Abb. 5.40; A; ■). Dieses Ergebnis belegt gleichzeitig die spezifische Bindung des Aptamers an den nativen IL-6R auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen, da der Anti-hIL-6R-Antikörper gegen den IL-6R gerichtet war.

### 6 Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit lag in der Selektion und Charakterisierung von RNA-Aptameren mit Affinität für den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R). Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsäuren (ssDNA, RNA), die durch Ausbildung dreidimensionaler Strukturen Zielmoleküle hoch spezifisch erkennen können.

1990 veröffentlichten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erstmalig Studien über die Anreicherung dieser kleinen Nukleinsäuren mit jeweils definierter Funktion: die Arbeitsgruppen um A. Ellington und J. Szostak [48], D. Robertson und G. Joyce [49], und C. Tuerk und L. Gold [50]. Die Generierung dieser funktionalen Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines kombinatorischen *in vitro* Selektionsprozesses, namens **SELEX**: Systematische Evolution von Liganden durch **EX**ponentielle Anreicherung.

Die Anwendung dieses Verfahrens ermöglicht die Entwicklung von Aptameren aus einer randomisierten Nukleinsäurebibliothek von etwa  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen für jedes denkbare Zielmolekül. Das Interesse an dieser Molekülklasse und die Zahl der Aptamer-Publikationen wachsen stetig.

Ein Grund dafür ist das sehr große und breit gefächerte Anwendungspotential dieser potenten Molekülklasse in der Biochemie und Medizin, verdeutlicht durch den Einsatz von Aptameren als Wirkstoffe, beispielsweise Pegaptanib [62].

Das Protein, welches in der vorliegenden Arbeit für eine Anreicherung von RNA-Aptameren ausgewählt wurde, ist der sIL-6R. Es handelt dabei um die extrazellulären Domänen des membranständigen IL-6R, generiert durch alternatives Spleißen oder limitierte Proteolyse.

Sowohl IL-6 als auch der sIL-6R sind an einer Vielzahl von Krankheiten, z. B. Rheumatoider Arthritis, Peritonitis oder Darmkrebs, beteiligt [2]. Eine mögliche Therapie liegt beispielsweise in der Anwendung neutralisierender Anti-IL-6R-Antikörper (Tocilizumab, Actemra, MRA) [5]. Eine alternative Strategie bietet möglicherweise die Entwicklung und Anwendung IL-6R-spezifischer Aptamere. Diese, mit dem Rezeptor zur spezifischen Interaktion befähigten Spezies könnten zu einer Blockade der Bindungsstellen für die natürlichen Interaktionspartner IL-6 bzw. gp130 führen und somit die Rezeptorfunktionen und folgende Signalgebungen inhibieren.

### 6.1 Selektion und Charakterisierung IL-6R-spezifischer RNA-Aptamere

Das Verfahren der *in vitro* Selektion wird angewandt, um Nukleinsäuren zu generieren, welche aufgrund ihrer komplexen dreidimensionalen Faltung ausgewählte Zielmoleküle hoch spezifisch binden können [51]. Bei diesen Nukleinsäuren handelt es sich zumeist um einzelsträngige DNAs oder RNAs. Im Vergleich zu ssDNA weisen RNA-Moleküle aufgrund ihrer 2'-OH-Gruppe eine erhöhte Flexibilität auf und können dementsprechend vielfältigere Faltungsmuster annehmen. Die meisten der bislang selektierten Aptamere basieren auf der Substanzklasse der Ribonukleinsäuren. Nachteilig muss in Betracht gezogen werden, dass die Stabilität natürlicher RNA gegenüber enzymatischem Abbau durch Nukleasen sehr gering ist (5.9).

Als ein Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung und Anwendung von RNA-Aptameren soll hier das unter dem Namen Macugen<sup>®</sup> bekannte VEGF-spezifische Aptamer erwähnt werden, welches momentan als einziges Aptamer Einsatz in der Medizin findet. Dies wird zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt [63].

Die Anreicherung von RNA-Aptameren für den IL-6R war das Ziel dieser Arbeit. Eine erste Voraussetzung für diese Selektion lag in der Herstellung einer RNA-Bibliothek ausreichend hoher Sequenzvielfalt. Den Ausgangspunkt bildete die ssDNA-Bibliothek R1, die der Arbeitsgruppe von Günter Mayer entstammte, mit einem randomisierten Bereich von 60 Nukleotiden, welcher die Variabilität des Pools determinierte (Vgl. Abb. 5.1). Mittels *in vitro* T7-Transkription wurden schätzungsweise  $10^{13}$  verschiedene RNA-Spezies produziert und als Startbibliothek in die erste Selektionsrunde eingesetzt. Eine weitere Voraussetzung stellte die Immobilisierung des Targets dar. Bei dem Targetprotein handelte es sich um die extrazellulären Domänen des IL-6R, über die die Ligandenbindung vermittelt wird.

Diese verkürzte Variante, der sogenannte lösliche IL-6R (sIL-6R), wurde dazu sowohl N-terminal als auch an Lysinresten biotinyliert (Abb. 5.5) und an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gekoppelt. Ob die Funktionalität des sIL-6R durch diese Modifikation beeinträchtigt wurde, konnte zu Beginn nicht geklärt werden, lediglich eine mögliche Degradation des Proteins konnte ausgeschlossen werden (Abb. 5.6).

Nach Inkubation der RNA-Bibliothek mit dem Zielmolekül unter physiologischen Selektionsbedingungen erfolgte die Trennung nicht-bindender RNA-Moleküle durch magnetische Separation. Mit steigender Zahl an Selektionszyklen wurde die Stringenz durch verstärkte Waschschrte erhöht (Tab. 5.1). Nach 16 Selektionsrunden, wobei stets auf eine Gegenselektion verzichtet wurde, war es gelungen, hoch affine Nukleinsäureliganden anzureichern. Belegt wurde dies in ersten Filterbindungsstudien (Abb. 5.10). Die unselektierte

## 6 DISKUSSION

Bibliothek wies dabei keine Affinität für den sIL-6R auf. Sowohl nach 9 als auch nach 16 Selektionsrunden wurde die angereicherte Bibliothek kloniert und daraus resultierende Monoklone sequenziert.

Das Ergebnis der 20 Sequenzanalysen waren sechs verschiedene Aptamere. Es ist anzumerken, dass ein Vergleich der Primärstrukturen der Aptamere untereinander eine auffällige Gemeinsamkeit hervorbrachte: ein definiertes, konserviertes G-reiches Bindungsmotiv: **5'-GGGGHGGCWGUGGWWGGG-3'** (Abb. 5.11). **H** kann dabei für Adenin, Uracil oder Cytosin bzw. **W** für Adenin oder Uracil stehen. Die 13 G-Nukleotide innerhalb dieses 19 Nukleotid-kurzen Bindungsmotivs lagen hauptsächlich aufeinander folgend als Dupletten, als Triplet oder als Quartett vor. Die Ausrichtung des Motivs variierte innerhalb der Aptamere, so befand sich dieses für das Aptamer 16-2 beispielsweise eher Richtung 3'-Ende (Nukleotide 48-66 von insgesamt 106 nt), für das Aptamer 16-3 eher am 5'-Ende des randomisierten Bereiches (Nukleotide 32 - 50 von insgesamt 106 nt).

Erste Filterbindungsstudien an den sIL-6R wurden mit vier ausgewählten Aptameren (16-1, 16-2, 16-3 und 16-8) unter radioaktiven Bedingungen durchgeführt. Alle vier ausgewählten Aptamere waren in der Lage, den nicht-immobilisierten bzw. unmodifizierten sIL-6R zu binden. Aus diesen ersten Untersuchungen resultierten Dissoziationskonstanten im Bereich von etwa 40 nM bis 400 nM. Diese Ergebnisse entstammten lediglich zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Da das Aptamer 16-3 demnach die höchste Affinität zum Rezeptor zu haben schien, wurde diese sIL-6R-Aptamer-Interaktion zur genaueren Charakterisierung weiter untersucht. Zunächst wurden für das Aptamer 16-3 eine Vielzahl von Filterbindungsstudien durchgeführt. Ein daraus resultierender  $K_d$ -Wert von 19 nM belegte die hochaffine Interaktion zwischen dem RNA-Aptamer und sIL-6R (Abb. 5.14).

Diese Affinität ist vergleichbar mit bereits durchgeführten Selektionen, deren Targetmoleküle ebenfalls Rezeptoren oder Membranproteine waren. Als Beispiele sollen hier das AMPA-spezifische Aptamer AN58 ( $K_d$ -Wert ~ 0,42 nM) [85], das HIV-gp120-spezifische RNA-Aptamer ( $K_d$ -Wert ~ 52 nM) [86], das den humanen Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) bindende Aptamer AP177 ( $K_d$ -Wert ~ 70 pM) [87], die an die Ektodomäne des Toll-like-Rezeptors 3 (TLR3) bindenden Aptamere ( $K_d$ -Wert ~ 3 nM) [88] und die RNA-Aptamere gegen den Wachstumsfaktor- $\beta$  Typ III Rezeptor ( $K_d$ -Wert: 1 nM) [89] erwähnt werden. Die Selektion von Aptameren gegen DC-SIGN, einen neuen Rezeptor, der u.a. eine wichtige Rolle während der Migration dendritischer Zellen spielt, führte zu bindenden DNA-Spezies mit  $K_d$ -Werten von etwa 20 nM [90].

## 6 DISKUSSION

Die Anwendung von Filterbindungsstudien zur Determination von Dissoziationskonstanten stellt eine schnelle und effiziente Methode dar. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien wurde neben der spezifischen Bindung des Radioliganden an das Zielprotein auch eine unspezifische, hydrophobe Interaktion mit der verwendeten Nitrozellulosemembran beobachtet, was den genauen Nachweis der Interaktion zwischen Aptamer und Protein beeinträchtigte. Daher war es stets notwendig, die Filterbindung der zu testenden RNAs in Abwesenheit von Protein separat zu bestimmen und von jedem einzelnen Messpunkt zu subtrahieren.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Natur der Nitrozellulosemembran. Das Material ist brüchig und verliert mit der Zeit an Bindungsaffinität, besonders bei Lagerung im Sonnenlicht [91], sodass Schwankungen im Bezug auf  $K_d$ -Werte oder Bindungsstärken keine Seltenheit waren. Diese auftretenden Schwankungen konnten durch häufige Wiederholungen der Bindungsstudien reduziert werden. Genaueren Quantifizierungen könnten beispielsweise auch Doppelfilterbindungsassays dienen, bei denen ein zweites Filterpapier (DEAE) unter der Nitrozellulosemembran all die RNAs auffängt, die nicht an die Nitrozellulose binden [91].

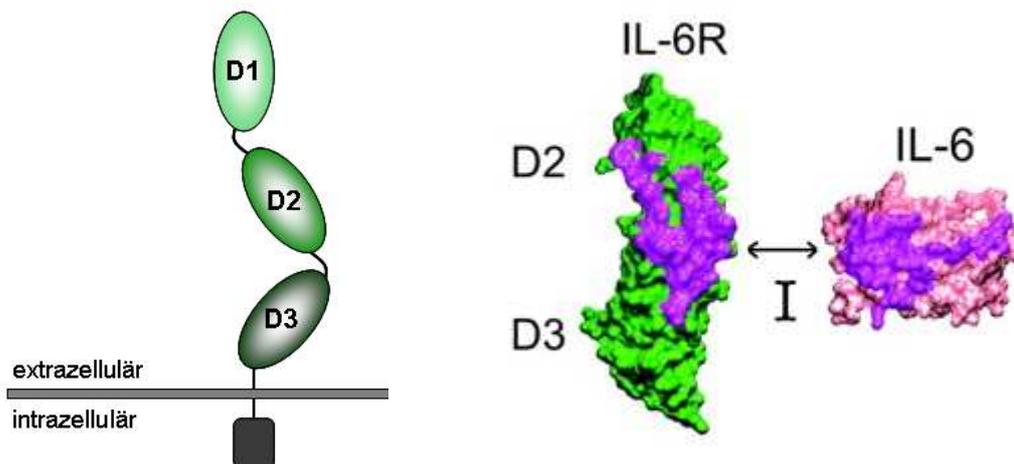
Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien wurden die Protein-Aptamer-Interaktionen zusätzlich in *Gel-Shift*-Assays untersucht, wobei die Trennung der Protein-Aptamer-Komplexe mittels nativer PAGE unter radioaktiven Bedingungen erfolgte. Diese Bindungsstudien, für welche ebenfalls keine Modifizierung des Proteins notwendig war, bestätigten die hochaffine Aptamer-sIL-6R-Wechselwirkung *in vitro* (Abb. 5.18).

Um die selektive Bindung der Aptamere an das sIL-6R-Protein zu untermauern, war es notwendig, die Spezifität der RNA-Spezies zu überprüfen. In nativen *Gel-Shift*-Assays wurde daher die Wechselwirkung zwischen dem sIL-6R-bindenden Aptamer 16-3 und zur Verfügung stehenden Kontrollproteinen untersucht. Daraus resultierend konnte eindeutig belegt werden, dass das Aptamer zwischen dem eigentlichen Targetprotein (sIL-6R) und den Kontrollproteinen (CEACAM1, Lysozym) diskriminieren konnte (Abb. 5.21).

Eine Unspezifität der Aptamer-sIL-6R-Interaktion sollte durch einen Vergleich der Bindung des Aptamers 16-3 mit der Kontroll-RNA O29 ausgeschlossen werden. Es handelt sich bei dieser Kontrolle, nicht wie bei dem unselektierten Pool R1, um eine RNA-Bibliothek, sondern um eine definierte RNA. Diese RNA entstammt einer gegen p53-gerichteten Aptamerselektion, welche zuvor in der Arbeitsgruppe von Professor Ulrich Hahn durchgeführt wurde (unveröffentlichte Daten). Als Resultat der Untersuchungen konnte eine unspezifische Interaktion des sIL-6R mit Nukleinsäuren erneut ausgeschlossen werden (Abb. 5.20).

## 6.2 Wettbewerbsstudien zwischen Aptamer und IL-6R-Liganden

IL-6 stimuliert seine Zielzellen durch Interaktion mit seinem Rezeptorkomplex, welcher sich aus einem Molekül IL-6R (klassisches *Signaling*) bzw. sIL-6R (*Trans-Signaling*) und zwei Molekülen gp130 zusammensetzt. Für die Interaktion mit IL-6R und gp130 enthält IL-6 drei konservierte Epitope (Bindestellen I, II und III) [23]. Zur Stimulation von Zellen muss IL-6 zunächst mit dem nicht direkt zur Signalgebung befähigten Rezeptor, IL-6R, einen ersten Komplex formieren (Bindestelle I, Abb. 6.1, rechts). Die extrazellulären Bereiche des IL-6R und sIL-6R gleichen einander und bestehen aus drei Domänen: D1, D2 und D3 [13]. Die aminoterminal Immunglobulin-ähnliche Domäne D1 wird nicht zur IL-6-Bindung und biologischen Aktivität benötigt, spielt aber bei Internalisierung und Stabilität des Rezeptors eine wichtige Rolle [92].



**Abb. 6.1: Schematische Darstellung des Membran-ständigen Interleukin-6-Rezeptors (nach [13]) und dessen Interaktion zu IL-6 (nach [23]).** Links: Der membranständige Interleukin-6-Rezeptor setzt sich aus den drei extrazellulären Domänen (grün): D1: N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne, D2 und D3: homologe, Zytokin-bindende Domänen (CBD) zusammen, gefolgt von einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne (schwarz). Rechts: Röntgenkristallographische Aufklärung der Interaktionsstelle I (violett) zwischen den Domänen D2 und D3 (grün) des IL-6R und dem Zytokin IL-6 (rosa) [23].

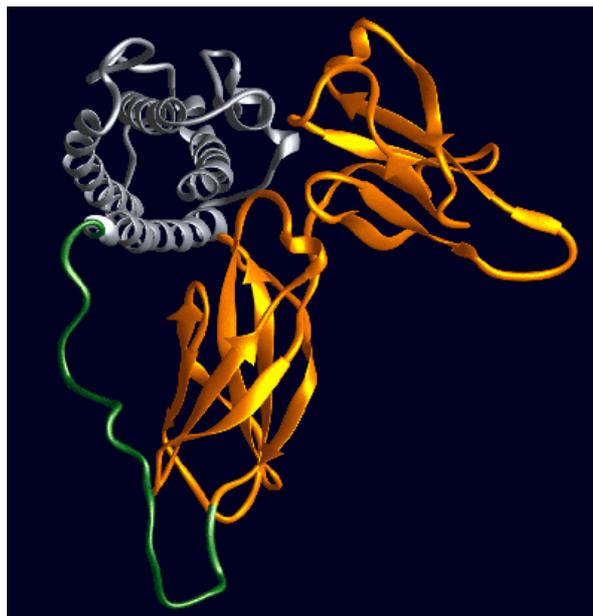
Die Bindung des Zytokins IL-6 erfolgt schließlich über die beiden Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 (Abb. 6.1) [13]. Die Dissoziationskonstante dieser spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktion liegt bei etwa 1 nM [20].

Özbek *et al.* untersuchten die Bindung des IL-6 an die alleinige Domäne D3 des humanen IL-6R. Diese Domäne genügt der Wechselwirkung, jedoch ist die Affinität im Vergleich zum Wildtyp-sIL-6R um eine Größenordnung verschlechtert. Der Grund liegt möglicherweise am Fehlen der D2-Domäne, da einige von deren Aminosäuren ebenfalls an der IL-6-Bindung beteiligt sind, jedoch nicht essentiell zu sein scheinen [13].

## 6 DISKUSSION

Um nun die Frage zu klären, in welchem Bereich die selektierten RNA-Aptamere an den sIL-6R binden bzw. ob eventuell die Aptamere und IL-6 die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor nutzen, wurden Wettbewerbsstudien durchgeführt. Weder in Filterbindungsstudien (5.23) noch in *Gel-Shift*-Assays (5.24) konnte durch IL-6 die Aptamerbindung an den Rezeptor blockiert werden. Dies führt zu der Annahme, dass das Aptamer den Rezeptor an einer anderen Stelle erkennt als IL-6.

Um diese Annahme zu verifizieren, wurde die Bindung des RNA-Aptamers 16-3 an Hyper-IL-6 untersucht. Hyper-IL-6 ist ein biologisch hoch aktives Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R mit einer Größe von 408 AS [20]. Das IL-6 wurde dazu über einen flexiblen Linker (13 AS, reich an Glycin und Serin) an den C-Terminus des sIL-6R fusioniert (Abb. 6.2). Um weiterhin die Größe dieses Designer-Zytokins so gering wie möglich zu halten, wurde sowohl auf die N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne D1, als auch auf einen kurzen C-terminalen Bereich verzichtet, da diese nicht für eine IL-6-Bindung essentiell sind [20].



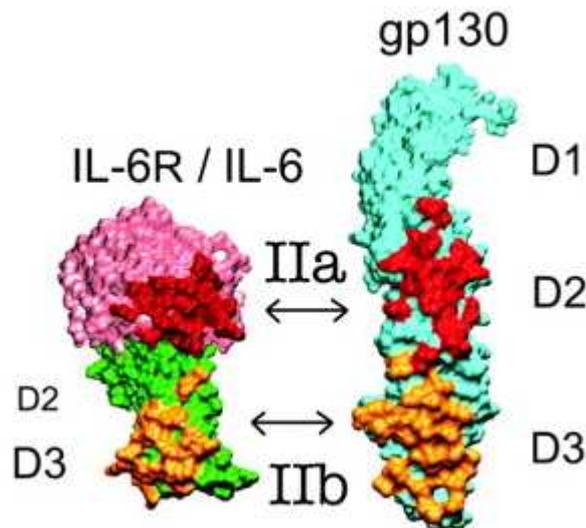
**Abb. 6.2: Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.** Das Fusionsprotein besteht aus dem N- und C-terminal verkürzten sIL-6R (Aminosäuren 113 – 323, orange) und IL-6 (grau), verbunden über einen flexiblen Aminosäure-Linker (grün) [20].

Sowohl mit Hilfe von Filterbindungsstudien (Abb. 5.34) als auch in *Gel-Shift*-Assays (Abb. 5.28) konnte eine Interaktion des Aptamers 16-3 und Hyper-IL-6 bestätigt werden. Dies führt zu der Erkenntnis, dass die Bindungsstelle des Aptamers im Bereich der Domänen D2 und D3 liegen sollte, da Hyper-IL-6 eine Defizienz der Domäne D1 des sIL-6R aufweist.

Das Glykoprotein gp130 ist als ein weiterleitender Rezeptor für die Signaltransduktion einer extrazellulären IL-6/IL-6R-Stimulation ins Zellinnere verantwortlich. Wie bereits erwähnt,

## 6 DISKUSSION

enthält IL-6 für die Interaktion mit den Rezeptoren IL-6R und gp130 drei konservierte Epitope (Bindestellen I, II und III). Die Bindestelle II (Abb. 6.3) stellt ein aus dem binären IL-6/IL-6R-Komplex zusammengesetztes Epitop dar, welches mit der Zytokin-bindenden Region (Domänen D2 und D3) des gp130 interagiert. Die Bindestelle III des IL-6 interagiert direkt mit gp130 im Bereich der Domäne D1, um schließlich einen aktiven, Signal-gebenden Komplex zu erzeugen.



**Abb. 6.3:** Schematische Darstellung der Interaktion des IL-6/IL-6R-Komplexes mit gp130 (nach [23]). Röntgenkristallographisch konnte die Interaktionsstelle II (rot und gold) zwischen dem Komplex aus IL-6R (grün) und IL-6 (rosa) und dem Signal-gebenden Rezeptor gp130 (hellblau) detailliert aufgeklärt werden [23].

Mit Hilfe von Strukturaufklärungen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der D3-Domäne des IL-6R und der D3-Domäne des gp130 wichtig für die Ausbildung des aktiven Komplexes bestehend aus IL-6, IL-6R und gp130 ist. Weder IL-6 noch der IL-6R allein sind in der Lage, gp130 zu aktivieren [23].

Nun stellt sich die Frage, ob die sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere *in vitro* die Interaktion des sIL-6R zu gp130 im Bereich der D3-Domäne blockieren können. Dazu wurde ein *Gel-Shift*-Assay (Abb. 5.28) durchgeführt. Neben der Bindung des Aptamers an Hyper-IL-6 konnte auch die Bindung an einen Komplex aus Hyper-IL-6 und sgp130Fc nachgewiesen werden. Alle drei Komponenten (Aptamer, Hyper-IL-6 und sgp130) waren zur Interaktion befähigt, was zu der Aussage führt, dass das Aptamer Hyper-IL-6 an einer von gp130 verschiedenen Stelle bindet. Zusammenfassend führen die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien zu der Erkenntnis, dass die sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere mit dem sIL-6R im Bereich der Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 interagieren. In diesem Bereich liegen ebenfalls die Bindestellen für die natürlichen Liganden IL-6 und gp130. *In vitro* wird deren Interaktion und Komplexbildung durch das Aptamer nicht gestört.

### 6.3 Verkürzung des sIL-6R bindenden Aptamers 16-3

Zur Identifikation für die Bindung der RNA-Aptamere an den sIL-6R wichtiger Basen wurde zunächst das Verfahren der sogenannten *Damage Selection* angewandt. Für diese Experimente wurde die RNA am 5'-Ende bzw. in parallelem Ansatz am 3'-Ende radioaktiv markiert. Durch alkalische Hydrolase wurden die Aptamere fragmentiert. Nach Neutralisation folgte die Inkubation dieser modifizierten RNAs mit dem Targetprotein sIL-6R, immobilisiert an Dynabeads<sup>®</sup>. Bindende Fragmente wurden eluiert und diese über ein denaturierendes PAA-Sequenziergel analysiert. Die Ergebnisse der *Damage Selection* von 5'-radioaktiv markierter RNA führten zu der Annahme, dass eine Wechselwirkung zwischen sIL-6R und den Aptameren nur bei Vorhandensein des 19-nt-Konsensusmotivs möglich war (Abb. 5.30) und legt die Vermutung einer direkten Interaktion dieser Basen mit ihrem Liganden nahe.

Aus der *Damage Selection* von 3'-radioaktiv markierter RNA konnten keine genauen Erkenntnisse gewonnen werden. Die Schwierigkeit lag dabei in der eindeutigen Zuordnung und Identifikation erhaltener Fragmente im Sequenziergel. Es konnten keine scharfen Banden erhalten werden. Fragmente, die sich in ihrer Länge nur um wenige Nukleotide unterschieden, bildeten einen Schmier. Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache, dass die zur *in vitro* RNA-Herstellung verwendete T7-RNA-Polymerase die Transkription an einer definierten Stelle beginnt, jedoch dazu tendiert, am Ende Template-unabhängige Nukleotide anzuhängen [91]. Die daraus resultierenden heterogenen 3'-Enden einer RNA sind für eine 3'-*Damage Selection* ungeeignet, da das Vorhandensein verschiedener RNA-Spezies die RNA-Sequenzierung und Gelanalyse erschwert.

Zur Optimierung der Erzeugung von 3'-Enden mit 100%iger Homogenität stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. So könnte beispielsweise das Hammerhead- oder Hepatitis-Delta-Virus-Ribozym (HDV-Ribozym) an das 3'-Ende der RNAs angehängt werden. Die Ribozym-vermittelte Selbstspaltung führt schließlich zur Produktion homogener RNA-Moleküle [91].

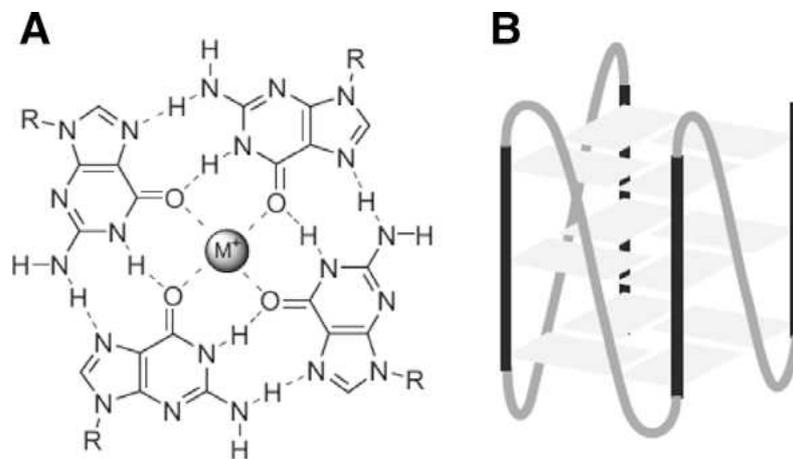
Da die Versuche zur *Damage Selection* lediglich die Annahme bekräftigten, dass das konservierte G-reiche Motiv mit einer Länge von 19 nt für die Erkennung des sIL-6R essentiell ist, wurde im Folgenden versucht, das Aptamer 16-3 unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturvorhersagen zu verkürzen.

Zunächst wurden drei Varianten erzeugt und getestet: 16-3\_A (19 nt), 16-3\_B (47 nt) und 16-3\_C (63 nt). Für das 47mer 16-3\_B konnte eine zum Wildtyp-Aptamer vergleichbare Affinität bestimmt werden (5.32). Dass die doppelsträngige Stammstruktur eine stabilisierende Wirkung auf die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur hat, belegt die

verminderte Affinität der Varianten 16-3\_A und 16-3\_C gegenüber dem Rezeptor. Jedoch bestätigte dies gleichzeitig, dass das 19 Nukleoid-kurze Bindemotiv allein für eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor ausreichend war.

#### 6.4 Hypothese eines G-Quadruplexes als stabilisierendes Strukturelement

Es ist bekannt, dass Nukleinsäuren mit einem verstärkten Vorkommen an Guaninresten stabilisierende G-Quartett- bzw. G-Quadruplex-Strukturen ausbilden können. Ein G-Quartett stellt eine selbstorganisierte, inter- oder intramolekulare Zusammenlagerung von vier Guaninbasen dar, welche sich durch Ausbildung nichtkovalenter Wasserstoffbrückenbindungen (Hoogsteen-Basenpaare) planar anordnen und gegenseitig stabilisieren (Abb. 6.4).



**Abb. 6.4:** Darstellung einer selbstorganisierten G-Quartett- bzw. G-Quadruplex-Struktur [93]. **A)** G-Quartett-Struktur, wobei vier Guaninbasen durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Im Inneren wird ein monovalentes Kationen ( $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$ ) fixiert. [94]. **B)** Dargestellung einer parallelen G-Quadruplex-Struktur bestehend aus drei G-Quartetten.

Zwei oder mehrere dieser G-Quartette können sich vertikal zu sogenannten G-Quadruplexen stapeln. G-Quadruplexe sind Kationen-bindende Komplexe, deren Struktur neben den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen zusätzlich durch Wechselwirkungen der G-Quartett-Stapel untereinander zusammengehalten wird. Eine zusätzliche Stabilität durch Kation-Dipol-Wechselwirkungen resultiert aus der Fixierung von monovalenten Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) zwischen den Ebenen der einzelnen G-Quartette [95].

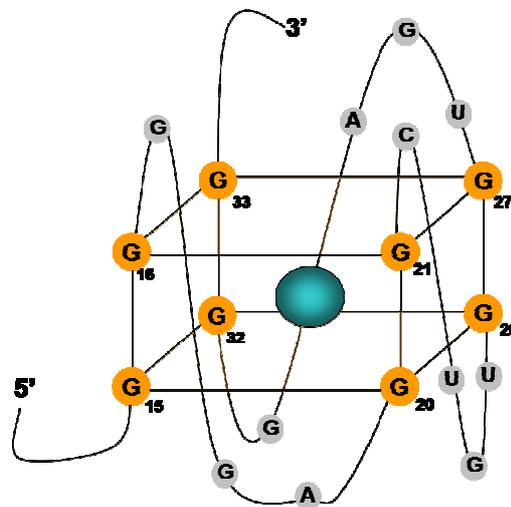
In der Literatur wurde bereits eine Vielzahl von RNA- als auch DNA-Aptameren beschrieben, welche G-Quadruplexe als stabilisierendes Strukturmotiv aufweisen. Als Beispiele sollen hier Aptamere mit Spezifität für das bovine Prionenprotein (bPrP) [96], für das Hormon Thyroxin [97] und für den Blutgerinnungsfaktor Thrombin [98] genannt werden.

Die in dieser Arbeit angereicherten RNA-Aptamere sind durch ein gemeinsames G-reiches Bindungsmotiv charakterisiert. Die für die Ausbildung eines G-Quadruplexes in Frage kom-

## 6 DISKUSSION

menden Guaninreste (Basen 15 bis 33) innerhalb des Aptamers 16-3\_B sind beispielhaft in der 19-nt-kurzen Sequenz: 5'-G<sub>15</sub>GGGXGGXXXGGXXXGGG<sub>33</sub>-3' fett hervorgehoben. Diese Guaninbasen liegen aufeinander folgend als Quartett, zwei Dupletten bzw. als Triplet vor. Die Formierung eines Quadruplexes bestehend aus lediglich zwei G-Quartetten wäre denkbar.

Zur Identifikation an einem potentiellen Quadruplex beteiligter Guaninbasen wurde die Sequenz des verkürzten Aptamers 16-3\_B Mutationsstudien unterzogen (5.34). Jeweils ein Guaninrest der innerhalb des Konsensusmotivs befindlichen fünf G-Dupletten wurde durch einen Uracilrest ausgetauscht. War der betroffene Guaninrest an der Protein-RNA-Interaktion beteiligt, sollte es nach der Mutation zu einer drastischen Reduktion der RNA-Bindung kommen. Die Mutationen der Basen G<sub>15</sub>, G<sub>21</sub>, G<sub>27</sub> und G<sub>32</sub> führten sowohl in Filterbindungsstudien als auch in *Gel-Shift-Assays* zu einem deutlichen Bindungsverlust (Abb. 5.34). Aufgrund dieser Ergebnisse kann die definitive Aussage getroffen werden, dass die genannten Reste G<sub>15</sub>, G<sub>21</sub>, G<sub>27</sub> und G<sub>32</sub> für die Bindung des Aptamers 16-3\_B an sIL-6R essentiell sind. Ob sich innerhalb des Konsensusmotivs des Aptamers 16-3\_B ein stabilisierender G-Quadruplex formiert, bleibt spekulativ. Abbildung 6.5 zeigt eine mögliche parallele Anordnung der konservierten Nukleotide bei Ausbildung eines G-Quadruplexes.



**Abb. 6.5:** Bindemotiv des verkürzten, sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamers 16-3\_B dargestellt als hypothetische parallele G-Quadruplex-Struktur. Zwei G-Quartette, bestehend aus jeweils vier Guaninbasen, formieren einen parallelen G-Quadruplex. Im Zentrum wird ein monovalentes Kation (Na<sup>+</sup> oder K<sup>+</sup>) fixiert. Die Nummerierung der Guaninreste entspricht der Position des Nukleotids in der Sequenz des Aptamers 16-3\_B (47 nt).

Zur weiteren Evaluierung dieser G-Quadruplex-Hypothese könnte ein Vergleich der Aptamerbindung in Abhängigkeit von monovalenten Alkalimetallkationen dienen. Wie bereits erwähnt, fixieren G-Quadruplexe die Kationen K<sup>+</sup> bzw. Na<sup>+</sup> zentral zwischen den einzelnen G-Quartetten [95]. Ohne diese strukturelle Einbindung wäre die Anordnung der

## 6 DISKUSSION

Guaninreste elektronisch ungünstig. Der zur *in vitro* Selektion verwendete 1x Selektionspuffer B beinhaltete sowohl Natrium- als auch Kaliumionen, so dass die Ausbildung von G-Quadruplexen möglich war. Mit dem Wissen, dass das Aptamer 16-3 mit dem sIL-6R hochaffin ( $K_d \sim 20$  nM) in diesem 1x Selektionspuffer B interagiert, wurden in Filterbindungsstudien weitere Pufferbedingungen getestet, wobei beispielsweise auf monovalente Kationen verzichtet wurde (Tab. 5.6). Da sich PBS aus den Komponenten  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zusammensetzt, wurde zu einem Tris-Puffersystem gewechselt, welches  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -frei sein sollte. Zunächst erfolgten Vergleiche zwischen den beiden Puffersystemen in Anwesenheit von zum PBS-Puffer gleicher Mengen an  $\text{K}^+$  bzw.  $\text{Na}^+$ -Ionen. Die Bindungsaffinität verschlechterte sich merklich. Ein Verzicht auf  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  bzw. auf beide Kationen im Tris-Puffersystem führte zu einer noch deutlicheren Reduktion der Protein-Aptamer-Interaktionen (5.4.4). Diese Resultate zeigen, dass die  $\text{K}^+$  bzw.  $\text{Na}^+$ -Kationen für die Bindung des Aptamers 16-3\_B an den sIL-6R notwendig sind. Ob nach Entfernen dieser Kationen aus dem Puffer die resultierende Reduktion der Bindung auf eine Destabilisierung des G-Quadruplex zurückzuführen ist, bleibt weiterhin spekulativ.

Eine dritte Möglichkeit, die G-Quadruplex-Hypothese zu evaluieren, läge in der Anwendung der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD). Schließlich könnten auch NMR- und Röntgenkristallstruktur-Analysen der Aufklärung dieses Strukturmotivs dienen.

### 6.5 Bindung der Aptamere an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen

Die spezifische Interaktion zwischen dem sIL-6R und den in dieser Arbeit angereicherten RNA-Aptameren konnte bereits in einer Vielzahl von *in vitro* Experimenten gezeigt und evaluiert werden. Es stellte sich infolgedessen die Frage, ob die RNA-Aptamere auch zur Erkennung des nativen, membranständigen IL-6R auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen befähigt waren. Zur Beantwortung dieser Fragestellung erschien die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl.

Die erste wichtige Voraussetzung zur Durchführung von Analysen am Durchflusszytometer lag in der Markierung der Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Molekülen. Mittels GTPS-Transkription und anschließender Addition von AlexaFluor®-Maleimiden konnte eine stabile Verbindung zwischen dem 5'-Ende der RNA und dem Fluorophor erhalten werden (Abb. 5.38).

Die zweite Voraussetzung war die Auswahl des geeigneten Zellkultursystems: die Prä-B-Zell-Linie BAF/3. Es handelt sich dabei um nicht adhärent wachsende, IL-3-abhängige Zellen murinen Ursprungs, welche sowohl gp130- als auch IL-6R-defizient sind. Um diese zum

## 6 DISKUSSION

Nachweis des IL-6R nutzen zu können, wurden die BAF/3-Zellen mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. zusätzlich mit der cDNA des IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL6R/TNF) stabil transfiziert. Durch Expression des Interleukin-6-Rezeptors und des gp130 auf deren Zelloberfläche genügt nun eine IL-6-Stimulation für das Zellwachstum. Diese Modifikationen der Wildtyp-Zelllinie fanden in der Arbeitsgruppe um Professor Stefan Rose-John an der Universität Kiel statt. Für diese Arbeit wurden die stabil-transfizierten BAF/3-Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Wachstum der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen in IL-3-defizientem, IL-6-haltigem Medium diente gleichzeitig dem Nachweis der IL-6R-Expression auf deren Oberfläche. Unter IL-6-Mangel konnten die Zellen nicht am Leben gehalten werden. Eine weitere Bestätigung der Rezeptorproduktion von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen konnte aus durchflusszytometrischen Analysen unter Verwendung eines murinen, hIL-6R-spezifischen Antikörpers erhalten werden (Abb. 5.37).

Wieviele Rezeptormoleküle sich auf der Oberfläche einer BAF/gp130/IL6R/TNF-Zelle befanden, war unklar. Bei Einsatz von etwa  $6 \times 10^{12}$  RNA-Molekülen (10 pmol) und  $5 \times 10^5$  Zellen in einer durchflusszytometrischen Analyse war die Möglichkeit gegeben, ausreichend Rezeptoren und damit Zellen zu markieren, um eine sichtbare Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu erhalten. In allen durchflusszytometrischen Analysen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Aptamere 16-3 und 16-3\_B den nativen IL-6R auf der Oberfläche der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen erkennen und binden konnten (Abb. 5.39).

Die Selektion der RNA-Aptamere war gegen die lösliche Form des Interleukin-6-Rezeptors (sIL-6R) gerichtet, wobei diese sich lediglich durch das Fehlen der zytoplasmatischen und intrazellulären Domänen vom membranständigen Rezeptor unterscheidet. Diese Form kann über zwei verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen erzeugt werden: durch limitierte Proteolyse des membranständigen Rezeptors bzw. durch alternatives Spleißen auf Ebene der mRNA [15]. Es verwundert daher nicht, dass die sIL-6R-spezifischen Aptamere zur Erkennung der Membran-ständigen Form des Rezeptors befähigt waren.

Die BAF/gp130-Zellen, welche keinen IL-6R auf ihrer Oberfläche besaßen, zeigten keine Interaktion mit den zu testenden RNA-Spezies. In weiteren Kontrollexperimenten diente ein Vergleich der spezifischen Aptamerbindung mit einer eventuell unspezifischen Bindung der unselektierten Startbibliothek R1 bzw. der Mutante 16-3\_B\_M5 an die Zelloberfläche zur Evaluierung der spezifischen Aptamer-IL-6R-Wechselwirkung.

Weitere durchflusszytometrische Analysen führten zu der Beobachtung, dass der von Frau Dr. Athena Chalaris erzeugte IL-6R-spezifische Antikörper die Bindung des Aptamers an den IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen inhibieren konnte (Abb. 5.40). Ob das sterische Gründe

## 6 DISKUSSION

hatte oder ob beide Spezies um eine Bindungsstelle konkurrierten, bleibt zu klären. Da auch das genaue Epitop, an welchem der Antikörper den IL-6R bindet, bislang nicht determiniert werden konnte, lässt sich auch keine weitere Hypothese zur genauen Bindestelle des Aptamers aufstellen.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Studien, dass die IL-6R-spezifischen RNA-Aptamere den nativen IL-6R im Bereich der Domänen D2 und D3 auf der Oberfläche von Zellen erkennen können. Die Frage, ob diese Interaktion funktional ist und somit eventuell Auswirkungen auf die Zellproliferation hat, oder ob die Aptamere lediglich markierende Eigenschaften besitzen, bleibt bislang unbeantwortet.

## 7 Ausblick

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung IL-6R-spezifischer RNA-Aptamere als möglicher Ansatz einer neuen, zur Antikörper-Technologie alternativen Strategie für die Behandlung IL-6-bedingter Krankheiten, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis.

Die Anreicherung und Charakterisierung der RNA-Aptamere konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die entwickelten hoch-affinen Ribonukleinsäuren besitzen die vielversprechende Fähigkeit, mit dem nativen Interleukin-6-Rezeptor auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen zu interagieren. Die bislang vorgenommenen Studien und die daraus erhaltenen Ergebnisse führten zu weiteren Fragestellungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht beantwortet werden konnten und die es in Zukunft zu klären gilt.

Die Frage, wo genau die Aptamere den Interleukin-6-Rezeptor binden, soll in weiterführenden Experimenten beantwortet werden. Bisher konnten die beiden Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 des IL-6R als Interaktionsbereich identifiziert werden. Eine genauere Determination der Bindungsregion ließe sich durch Interaktionsstudien der Aptamere mit den einzelnen Domänen D2 und D3 realisieren.

Auf Ebene der Aptamere könnten noch weitere Analysen folgen, beispielsweise die Aufklärung der an der Interaktion mit dem Rezeptor beteiligten Basen. Die Erforschung und Aufklärung der Aptamer-Sekundärstruktur nach chemischer Modifikation der RNA mittels DMS, Kethoxal oder CMCT (sog. *Chemical Probing*) gefolgt von *Damage Selection*-Experimenten wären denkbar.

Detaillierteste Erkenntnisse bezüglich der dreidimensionalen Wechselwirkung zwischen Aptamer und IL-6R könnten schließlich röntgenkristallographische Strukturanalysen liefern.

Die vielleicht wichtigsten Fragestellungen, welches Potential in der Aptamer-Ligand-Wechselwirkung steckt und welchen genauen Einfluss die Aptamere auf die IL-6-vermittelte Signaltransduktion bzw. IL-6-stimulierte Zellproliferation haben, bleiben in zukünftigen Versuchen zu klären.

Eine Möglichkeit zur Beantwortung dieser Fragen liegt in der Durchführung von Proliferationsstudien. In solchen Tests würde beispielsweise die IL-6-vermittelte Zellproliferation von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen bei Anwesenheit der IL-6-spezifischen Aptamere beobachtet, was Rückschlüsse auf eine mögliche Blockade der IL-6-vermittelten Signalgebung zuließe.

## 7 AUSBLICK

Eine alternative Strategie bietet die Analyse der IL-6R-abhängigen Synthese von Akute-Phase-Proteinen (z. B. ACT, Haptoglobin) in HepG2-Hepatomzellen [72]. HepG2-Hepatomzellen produzieren Akute-Phase-Proteine bei Stimulation durch den IL-6/IL-6R-Komplex. Wären die Aptamere fähig, die IL-6/IL-6R-vermittelte Wirkung zu blockieren, würde die Sekretion dieser Akute-Phase-Proteine inhibiert.

Eine alternative Anwendung der Aptamere könnte in der Kombination mit der siRNA-Technologie liegen und als eine sehr vielversprechende Methode zur zielgerichteten Aufnahme funktioneller siRNAs in Zellen beitragen. Die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen zellulären Mechanismus zur gezielten Degradation ausgewählter mRNAs [86, 99]. RNAi-basierte Wirkstoffe besitzen ein hohes Anwendungspotential, da die siRNAs durch eine hohe Targetspezifität, geringe Immunogenität und einfaches Design charakterisiert sind. Eine Voraussetzung zur erfolgreichen RNAi-Anwendung *in vivo* liegt in der spezifischen Passage der siRNAs durch die Zellmembran. Chimären aus definierten siRNAs und den IL-6R-spezifischen RNA-Aptameren könnten nach Bindung an den IL-6R internalisiert werden. In der Zelle wäre die siRNA nach Prozessierung durch Dicer in der Lage, gewählte mRNAs gezielt auszuschalten.

Welche Möglichkeiten in dieser neuartigen Technologie stecken, konnten McNamara *et al.* nach Kopplung PSMA-spezifischer Aptamere an siRNAs zeigen [99]. Diese Chimären wurden erfolgreich in die Zelle eingebracht und konnten gewünschte Zielgene stilllegen. Das Potential dieser Chimäre verdeutlichten Experimente im Xenograft-Modell. So führten die Aptamer-siRNA-Konstrukte zur Rückbildung von Prostata-Krebszellen [99]. Diese Aptamere wurden des Weiteren genutzt, um andere therapeutische Wirkstoffe wie Toxine [100], Doxorubicin [101] oder Nanopartikel [102] diesen Tumoren zugänglich zu machen.

Für eine spätere Anwendung der IL-6R-spezifischen Aptamere wäre es weiterhin von großem Interesse, die Stabilität der Ribonukleinsäuren gegenüber RNasen und Hydrolyse zu verbessern, beispielsweise durch das Einfügen postselektiver Modifikationen. Würde dies zu Affinitätsverlusten gegenüber dem Rezeptor führen, könnte eine neue *in vitro* Selektion unter Verwendung 2'-modifizierter Nukleotide durchgeführt werden. Als Target könnten dazu Bereiche des IL-6R zum Einsatz kommen, die für die Interaktion zu IL-6 bzw. gp130 wichtig sind. Durch kompetitive Elution mit IL-6 oder auch gp130 könnten zum anderen IL-6R-bindende Spezies mit einem verstärkten Potential zur Inhibition der IL-6-vermittelten Signalgebung angereichert werden.

**Literaturverzeichnis**

1. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. 300 ( Pt 2): p. 281-90.
2. Jones, S.A., et al., *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. FASEB J, 2001. 15(1): p. 43-58.
3. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 2006. 8 Suppl 2: p. S2.
4. Noma, Y., et al., *Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter*. Nature, 1986. 319(6055): p. 640-6.
5. Yoshizaki, K., et al., *Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody*. Springer Semin Immunopathol, 1998. 20(1-2): p. 247-59.
6. Mihara, M., et al., *Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor*. Br J Rheumatol, 1995. 34(4): p. 321-5.
7. Kawano, M., et al., *Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas*. Nature, 1988. 332(6159): p. 83-5.
8. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 1-21.
9. Suematsu, S., et al., *Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(1): p. 232-5.
10. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. 195(4): p. 173-83.
11. Varghese, J.N., et al., *Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(25): p. 15959-64.
12. Grotzinger, J., et al., *IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?* Biol Chem, 1999. 380(7-8): p. 803-13.
13. Ozbek, S., et al., *The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association*. J Biol Chem, 1998. 273(33): p. 21374-9.
14. Taga, T., *IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130*. Res Immunol, 1992. 143(7): p. 737-9.

## LITERATURVERZEICHNIS

15. Rose-John, S., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors*. Acta Biochim Pol, 2003. 50(3): p. 603-11.
16. Scheller, J., Grötzinger, J., and Rose-John, Stefan, *Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren*. Biospektrum, 2007. 13. Jahrgang: p. 250-253.
17. [www.uni-kiel.de/immunologie/ag/schuetze/Vorlesung/cytokine.pdf](http://www.uni-kiel.de/immunologie/ag/schuetze/Vorlesung/cytokine.pdf).
18. Mullberg, J., et al., *The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology*. Eur Cytokine Netw, 2000. 11(1): p. 27-38.
19. Jones, S.A., et al., *C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding*. J Exp Med, 1999. 189(3): p. 599-604.
20. Fischer, M., et al., *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. 15(2): p. 142-5.
21. Taniguchi, T. and A. Takaoka, *A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(5): p. 378-86.
22. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. 374(Pt 1): p. 1-20.
23. Boulanger, M.J., et al., *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex*. Science, 2003. 300(5628): p. 2101-4.
24. Frieling, J.T., et al., *Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome*. J Infect Dis, 1995. 171(2): p. 469-72.
25. Yokoyama, A., et al., *Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 156(5): p. 1688-91.
26. Padberg, F., et al., *CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1999. 99(2): p. 218-23.
27. Stubner, S., et al., *Interleukin-6 and the soluble IL-6 receptor are decreased in cerebrospinal fluid of geriatric patients with major depression: no alteration of soluble gp130*. Neurosci Lett, 1999. 259(3): p. 145-8.
28. Jablonska, E., *Changes in sIL-6R and sTNF-Rs release by PMNs and the serum levels in breast cancer patients at different stages of treatment*. Cytokine, 1998. 10(7): p. 540-3.
29. Kyrtsolis, M.C., et al., *Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma*. Br J Haematol, 1996. 93(2): p. 398-400.
30. Honda, M., et al., *Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection*. J Immunol, 1992. 148(7): p. 2175-80.

## LITERATURVERZEICHNIS

31. Nowell, M.A., et al., *Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130*. J Immunol, 2003. 171(6): p. 3202-9.
32. Cronstein, B.N., *Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007. 65 Suppl 1: p. S11-5.
33. EMEA, *Anhang I: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels*. Website der europäischen Arzneimittelagentur (EMA).
34. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. J Leukoc Biol, 2006. 80(2): p. 227-36.
35. S. Rashmi, V.U., *A novel therapeutic approach in rheumatoid arthritis*. Molecules of the Millennium, 2004.
36. Mayer, G., *The chemical biology of aptamers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(15): p. 2672-89.
37. Rajendran, M. and A.D. Ellington, *Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc*. Anal Bioanal Chem, 2008. 390(4): p. 1067-75.
38. Huizenga, D.E. and J.W. Szostak, *A DNA aptamer that binds adenosine and ATP*. Biochemistry, 1995. 34(2): p. 656-65.
39. Holeman, L.A., et al., *Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers*. Fold Des, 1998. 3(6): p. 423-31.
40. Schurer, H., et al., *Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A*. Bioorg Med Chem, 2001. 9(10): p. 2557-63.
41. Watrin, M., et al., *In vitro selection of RNA aptamers derived from a genomic human library against the TAR RNA element of HIV-1*. Biochemistry, 2009. 48(26): p. 6278-84.
42. Tucker, C.E., et al., *Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. 732(1): p. 203-12.
43. Ruckman, J., et al., *2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain*. J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20556-67.

## LITERATURVERZEICHNIS

44. Mendonsa, S.D. and M.T. Bowser, *In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis*. J Am Chem Soc, 2005. 127(26): p. 9382-3.
45. Sullenger, B.A., et al., *Analysis of trans-acting response decoy RNA-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transactivation*. J Virol, 1991. 65(12): p. 6811-6.
46. Raddatz, M.S., et al., *Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. 47(28): p. 5190-3.
47. James, W., *Aptamers*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2000: p. 4848.
48. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. 346(6287): p. 818-22.
49. Robertson, D.L. and G.F. Joyce, *Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA*. Nature, 1990. 344(6265): p. 467-8.
50. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. 249(4968): p. 505-10.
51. Gopinath, S.C., *Methods developed for SELEX*. Anal Bioanal Chem, 2007. 387(1): p. 171-82.
52. Pristoupil, T.I. and M. Kramlova, *Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes*. J Chromatogr, 1968. 32(4): p. 769-70.
53. Mosing, R.K. and M.T. Bowser, *Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX)*. Methods Mol Biol, 2009. 535: p. 33-43.
54. Goodman, S.D., et al., *In vitro selection of integration host factor binding sites*. J Bacteriol, 1999. 181(10): p. 3246-55.
55. Jensen, K.B., et al., *Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(26): p. 12220-4.
56. Homann, M. and H.U. Goring, *Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes*. Nucleic Acids Res, 1999. 27(9): p. 2006-14.
57. Blank, M., et al., *Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen*. J Biol Chem, 2001. 276(19): p. 16464-8.

## LITERATURVERZEICHNIS

58. Mayer, G. and T. Hover, *In vitro selection of ssDNA aptamers using biotinylated target proteins*. *Methods Mol Biol*, 2009. 535: p. 19-32.
59. *Preclinical and phase IA clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration*. *Retina*, 2002. 22(2): p. 143-52.
60. Que-Gewirth, N.S. and B.A. Sullenger, *Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers*. *Gene Ther*. 14(4): p. 283-291.
61. Klussmann, S., *Functional Oligonucleotides and Their Applications*. The Aptamer Handbook, 2006. 1. Auflage
62. Ng, E.W., et al., *Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(2): p. 123-32.
63. Mayer, G.F., M., *Aptamere als Therapeutika und Werkzeuge zur Wirkstoffsuche*. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2007. 36 (6): p. 432 - 436.
64. Ireson, C.R. and L.R. Kelland, *Discovery and development of anticancer aptamers*. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(12): p. 2957-62.
65. Tanaka, K.A., et al., *In-vitro evaluation of anti-factor IXa aptamer on thrombin generation, clotting time, and viscoelastometry*. *Thromb Haemost*, 2009. 101(5): p. 827-33.
66. Schwarz, A. and M. Famulok, *Aptamere und Ribozyme aus kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken*. *Biospektrum*, 2001. 7. Jahrgang.
67. Rose-John, S., *Zytokine in der Medizin*. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 2003. 46: p. 182-187.
68. Ploen, D., *Strukturelle Untersuchungen viraler RNA-Pseudoknoten*. 2008.
69. Qiagen, *QIAexpress Detection and Assay Handbook*. october 2002. Third Edition.
70. Arcone, R., et al., *Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector*. *Eur J Biochem*, 1991. 198(3): p. 541-7.
71. van Dam, M., et al., *Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding*. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 15285-90.
72. Jostock, T., et al., *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses*. *Eur J Biochem*, 2001. 268(1): p. 160-7.
73. Mackiewicz, A., et al., *Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins*. *J Immunol*, 1992. 149(6): p. 2021-7.

## LITERATURVERZEICHNIS

74. Schooltink, H., et al., *Structural and functional studies on the human hepatic interleukin-6 receptor. Molecular cloning and overexpression in HepG2 cells.* Biochem J, 1991. 277 ( Pt 3): p. 659-64.
75. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
76. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation.* Nucleic Acids Res, 1988. 16(13): p. 6127-45.
77. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
78. Murray, V., *Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction.* Nucleic Acids Res, 1989. 17(21): p. 8889.
79. Dickinson, B., *Trainingshandbuch.* FACScan.
80. Thermo-Fisher-Scientific-Inc. [Web Page] 2009 [cited; Available from: <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=8D38BA83-EFDC-421A-853F-E96EBA380612%20>].
81. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.* Nucleic Acids Research, 2003. 31(13): p. 3406-3415.
82. Davis, J.T., *40 Jahre G-Quartetts: von 5'-GMP zur Molekularbiologie und Supramolekularen Chemie.* Angewandte Chemie, 2004. 116: p. 684-716.
83. Landweber, L.F., *Experimental RNA evolution.* Trends Ecol Evol, 1999. 14(9): p. 353-358.
84. Lambert, D., et al., *The influence of monovalent cation size on the stability of RNA tertiary structures.* J Mol Biol, 2009. 390(4): p. 791-804.
85. Huang, Z., et al., *RNA aptamers selected against the GluR2 glutamate receptor channel.* Biochemistry, 2007. 46(44): p. 12648-55.
86. Zhou, J., et al., *Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells.* Nucleic Acids Res, 2009. 37(9): p. 3094-109.
87. Chang, Y.C., et al., *Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses.* FASEB J, 2009. 23(9): p. 3078-88.
88. Watanabe, T., et al., *Isolation of RNA aptamers against human Toll-like receptor 3 ectodomain.* Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2006(50): p. 251-2.

## LITERATURVERZEICHNIS

89. Ohuchi, S.P., T. Ohtsu, and Y. Nakamura, *Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface*. *Biochimie*, 2006. 88(7): p. 897-904.
90. Hui, Y., et al., *Selection of DNA aptamers against DC-SIGN protein*. *Mol Cell Biochem*, 2007. 306(1-2): p. 71-7.
91. Hartmann, R.K., et al., *Handbook of RNA Biochemistry*. 2005. 1.
92. Vollmer, P., et al., *Yeast expression of the cytokine receptor domain of the soluble interleukin-6 receptor*. *J Immunol Methods*, 1996. 199(1): p. 47-54.
93. Joachimi, A., A. Benz, and J.S. Hartig, *A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities*. *Bioorg Med Chem*, 2009. 17(19): p. 6811-5.
94. Tang, C.F. and R.H. Shafer, *Engineering the quadruplex fold: nucleoside conformation determines both folding topology and molecularity in guanine quadruplexes*. *J Am Chem Soc*, 2006. 128(17): p. 5966-73.
95. Davis, J.T., *40 Jahre G-Quartetts: von 5'-GMP zur Molekularbiologie und Supramolekularen Chemie*. *Angew Chem* 2004. 116: p. 684-716.
96. Mashima, T., et al., *Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein*. *Nucleic Acids Res*, 2009.
97. Levesque, D., et al., *In vitro selection and characterization of RNA aptamers binding thyroxine hormone*. *Biochem J*, 2007. 403(1): p. 129-38.
98. del Toro, M., et al., *Study of the interaction between the G-quadruplex-forming thrombin-binding aptamer and the porphyrin 5,10,15,20-tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-21,23H-porphyrin tetratosylate*. *Anal Biochem*, 2008. 379(1): p. 8-15.
99. McNamara, J.O., 2nd, et al., *Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras*. *Nat Biotechnol*, 2006. 24(8): p. 1005-15.
100. Chu, T.C., et al., *Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells*. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 5989-92.
101. Bagalkot, V., et al., *An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. 45(48): p. 8149-52.
102. Farokhzad, O.C., et al., *Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(16): p. 6315-20.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit, für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für seine Unterstützung, seine Geduld und sein Vertrauen bedanken.

Herrn Professor Dr. Reinhardt Bredehorst danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Stefan Rose-John, Herrn Professor Jürgen Scheller, Herrn Professor Joachim Grötzinger, Frau Dr. Inken Lorenzen und Frau Dr. Athena Chalaris der Universität Kiel für den stetigen Informationsaustausch und die Bereitstellung der Proteine und Zellsysteme, welche Basis der vorliegenden Arbeit waren und wesentlich zu deren Erfolg beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Nicolas Piganeau für seine sehr guten Ideen, Ratschläge, Diskussionen und Korrekturen. Viele humorvolle Momente werden mir in Erinnerung bleiben.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Günter Mayer für die freundliche Einladung nach Bonn, die kurzzeitige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und all seine Hilfestellungen beim Erlernen des *in vitro* Selektionsverfahrens.

Bei Frau Tijana Zivkovic bedanke ich mich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion, die angenehme und produktive Zusammenarbeit an unserem gemeinsamen Projekt und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders dankbar bin ich für die durch den DAAD ermöglichte Zusammenarbeit mit den Herren Viswatej Avutu und Michael Yen. Es war mir eine große Freude, diese beiden sehr intelligenten und hilfsbereiten jungen Männer aus den USA kennenlernen zu dürfen. Vorallem die Zusammenarbeit mit Vishu hat großen Anteil am Erfolg der *in vitro* Selektion und somit auch an dieser Doktorarbeit.

## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Hasan Vatandaslar und Frau Kristina Szameit für die Mitarbeit an diesem Projekt.

Frau Elena Wasiljew und Frau Margot Binnewies danke ich für ihr stets hilfsbereites und unterstützendes Wesen.

Insbesondere geht mein Dank an Herrn Volker Lenski, Frau Daniela Otto, Frau Kirstin Gerstle und Frau Martina Winter für all ihre liebevolle Unterstützung sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts. Ich werde stets mit euch in Freundschaft verbunden sein.

Ich möchte mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe, die nicht namentlich erwähnt wurden, für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt schließlich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern, die mich alle auf ihre Weise unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Euch widme ich diese Arbeit.

## SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben. In diese Arbeit eingebrachte Ergebnisse aus Praktika und Projektstudien entstammen meiner Anleitung.

Hamburg, Oktober 2009

Cindy Meyer

## Anhang

### Gefahrstoffsymbole

|    |                      |    |                      |
|----|----------------------|----|----------------------|
| E  | explosionsgefährlich | O  | brandfördernd        |
| C  | ätzend               | F  | leichtentzündlich    |
| F+ | hochentzündlich      | T  | giftig               |
| T+ | sehr giftig          | Xn | gesundheitsschädlich |
| Xi | reizend              | N  | umweltgefährlich     |

### Gefahrstoffinformationen

| Verbindung             | Gefahrstoffsymbol | R-Sätze                                    | S-Sätze           |
|------------------------|-------------------|--|-------------------|
| Acrylamid              | T                 | 45-46-20/21-25-36/38-<br>43-48/23/24/25-62 | 53-45             |
| Ampicillin-Natriumsalz | Xn                | 36/37/38-42/43                             | 22-26-36/37       |
| APS                    | O, Xn             | 8-22-36/37/38-42/43                        | 22-24-26-37       |
| BCIP                   | -                 | -  | 22-24/25          |
| Bisacrylamid           | Xn                | 20-22                                      | 22                |
| DTT                    | Xn, Xi            | 22-36/38                                   | 36/37/39          |
| Essigsäure             | C                 | 10-35                                      | 23.2-26-45        |
| Ethanol                | F                 | 11   | 7-16              |
| EtBr                   | T+                | 22-26-36/37/38-68                          | 26-28.2-36/37-45  |
| Methanol               | F, T              | 11-23/24/25-<br>39/23/24/25                | 7-16-36/37-45     |
| NaOH                   | C                 | 35   | 26-36/37/39-45    |
| NBT                    | Xn                | 20/21-33                                   | 22-45             |
| Penicillin             | Xn                | 42/43                                      | 22-36/37          |
| Salzsäure, konz.       | C                 | 34-37                                      | 26-36/37/39-45    |
| SDS                    | F, Xn, Xi         | 11-21/22-36/37/38                          | 26-36/37          |
| Streptomycinsulfat     | T                 | 61-22                                      | 36/37/39-45/53    |
| TEMED                  | F, C              | 11-20/22-34                                | 16-26-36/37/39-45 |
| Tris                   | Xi                | 36/38                                      | -                 |
| Xylen Cyanol FF        | Xi                | 36   | 24                |

**Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I und II**

| <b>Cas-Nummer</b> | <b>Stoffname (IUPAC) und Cat.</b> | <b>Verfahren und eingesetzte Menge</b>  | <b>Kategorie (I oder II)</b>        |
|-------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|
| 79-06-1           | Acrylamid                         | 30-40%ige, wässrige Lösungen zur Polymerisation.<br>Menge: 30 ml                                      | K1B, M1B, R <sub>F</sub> 2          |
| 1239-45-8         | Ethidiumbromid                    | 10 mg/ml wässrige Lösungen zur Färbung von Agarosegelen (0,5 mg/ml Endkonzentration).<br>Menge: 50 ml | M2                                  |
| 50-00-0           | Formaldehyd                       | 37%ige Lösung zur Silberfärbung von Proteinen.<br>Menge: 50 ml  | K2                                  |
| 68-12-2           | N,N-Dimethylformamid              | BCIP-Lösung zur Färbung von Western Blots.<br>Menge: 500 ml   | R <sub>E</sub> 1B                   |
| 10043-35-3        | Borsäure                          | Bestandteil von TBE-Puffer.   | R <sub>E</sub> 1B R <sub>F</sub> 1B |