

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

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Universität Hamburg eingereichte

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

*Dr. rer. nat.*

vorgelegt von

**Tijana Živković**

Hamburg, 25.03.2010

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2006 bis März 2010 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Departments Chemie der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

**Teile dieser Arbeit wurden**

als Patent „Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2009 056 945.6“ angemeldet und

als Poster bei dem 3. Treffen der Norddeutschen Biophysiker in Borstel präsentiert.

Gutachter:

Herr Professor Dr. Ulrich Hahn

Herr Professor Dr. Reinhard Bredehorst

Tag der Disputation: 07.05.2010

Fragesteller:

Herr Professor Dr. Ulrich Hahn

Herr Professor Dr. Markus Fischer

Herr Dr. Thomas Hackl

Für meine Eltern  
und  
meine Schwester

Viele Ansichten sind heute so selbstverständlich geworden, dass man sich kaum vorstellen kann, wie revolutionär sie seinerzeit waren und was für einen großartigen Durchbruch sie bedeuteten.

[John Farndon aus „Die berühmtesten Wissenschaftler“]

„Die Welt ist etwas Absolutes. Und die Suche nach [ihren] Gesetzen erschien mir als die erhabenste wissenschaftliche Aufgabe des Lebens.“

[Max Planck]

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Kurzfassung.....	VII
Abstract .....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1. Zytokine.....	1
1.1.1. Das Interleukin-6 (IL-6) .....	1
1.1.2. Der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R).....	2
1.1.3. Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.....	6
1.2. Aptamere .....	7
1.2.1. Aptamere <i>versus</i> Antikörper .....	8
1.2.2. G-Quadruplexe .....	11
1.3. <i>In vitro</i> Selektion .....	13
1.4. Zielsetzung.....	16
2. Material .....	17
2.1. Geräte.....	17
2.2. Chemikalien.....	18
2.3. Nukleotide und Radionukleotide .....	18
2.4. Enzyme .....	18
2.5. Protein- und DNA-Standards.....	18
2.6. Kommerziell erhältliche Kits.....	18
2.7. Puffer, Lösungen und Medien .....	19
2.8. Materialien für die Aptamerselektion .....	21
2.9. Synthetische Oligonukleotide.....	21
2.10. Proteine .....	23
2.11. Verwendetes Plasmid und Bakterienstamm.....	24
2.12. Zelllinien .....	24
3. Methoden.....	25
3.1. Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	25
3.1.1. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	25

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	25
3.1.3.	Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid .....	26
3.1.4.	Nachweis von Nukleinsäuren mittels <i>UV-Shadowing</i> .....	26
3.1.5.	Nachweis von Nukleinsäuren mittels Autoradiographie.....	26
3.1.6.	Extraktion von DNA aus Polyacrylamidgelen .....	26
3.1.7.	Natriumacetat-Ethanolpräzipitation .....	27
3.1.8.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	27
3.1.9.	Reinigung von PCR-Produkten .....	27
3.2.	Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren .....	27
3.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
3.2.2.	Kolonie-PCR .....	29
3.2.3.	DNA-Strangtrennung mittels Dynabeads <sup>®</sup> M-280.....	29
3.2.4.	Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA .....	30
3.3.	Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse.....	30
3.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.3.2.	Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen mit <i>Coomassie Brilliant Blue</i> .....	31
3.3.3.	Biotinylierung von Proteinen .....	31
3.3.4.	Dialyse.....	32
3.3.5.	Dot Blot .....	32
3.3.6.	Kopplung biotinylierter Proteine an magnetische Partikel (Dynabeads <sup>®</sup> M-280). .....	32
3.4.	Durchführung der <i>in vitro</i> Selektion (SELEX) mittels Dynabeads <sup>®</sup> .....	32
3.5.	Klonierung der angereicherten DNA-Bibliothek .....	33
3.5.1.	Restriktion der DNA und des Vektors .....	33
3.5.2.	Dephosphorylierung des Vektors .....	34
3.5.3.	Ligation .....	34
3.5.4.	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	34
3.5.5.	Transformation mittels Elektroporation .....	35
3.5.6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	35
3.5.7.	DNA-Sequenzierung .....	35
3.6.	Untersuchung der Aptamer-Protein-Interaktionen .....	36
3.6.1.	Analytische Filterbindungsstudien .....	36
3.6.2.	Sekundärstrukturanalyse .....	37

## Inhaltsverzeichnis

3.6.3.	Analyse der Aptamerbindung mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	37
3.6.4.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Oberflächen-Plasmonresonanz . .....	38
3.7.	CD-Spektroskopie .....	39
3.8.	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	39
3.9.	Durchflusszytometrie.....	40
3.9.1.	Nachweis der IL-6R-Expression auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen.....	40
3.9.2.	Analyse der Bindung von ssDNA-Aptameren an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen. .....	41
4.	Ergebnisse .....	42
4.1.	Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für sIL-6R .....	42
4.1.1.	Biotinylierung des sIL-6R und Kopplung an Dynabeads® M-280 .....	42
4.1.2.	Selektion sIL-6R spezifischer DNA-Aptameren.....	44
4.2.	Erste Filterbindungsstudien: Anreicherung von Aptameren?.....	46
4.3.	Klonierung und Sequenzierung angereicherter DNA-Aptamere.....	48
4.4.	Analyse der sIL-6R-spezifischen DNA-Aptamere.....	48
4.4.1.	Filterbindungsstudien monoklonaler sIL-6R-bindender DNA-Aptamere .....	48
4.4.2.	Sekundärstrukturanalysen (mfold) .....	51
4.4.3.	Untersuchung der Aptamerspezifität.....	52
4.4.4.	Interaktion der Aptamere 13-15 und 13-27 mit Hyper-IL-6 .....	53
4.5.	Minimalmotivsuche der Aptamere 13-15 und 13-27 .....	55
4.5.1.	Verkürzung der Aptamere .....	55
4.5.2.	Bindungsstudien aller fünf G-reichen Varianten der selektierten Aptamere (D-Varianten) .....	60
4.6.	Kompetitionsstudien .....	62
4.7.	Charakterisierung der verkürzten Aptamere.....	64
4.7.1.	Einfluss von Mutationen in den G-Triplets.....	64
4.7.2.	T am 5'- und/oder 3'-Ende des Aptamers 13-27_D.....	65
4.7.3.	Loop-Varianten des Aptamers 13-27_D .....	67
4.7.4.	Spezifität des kurzen Aptamers 13-27_D-T.....	69
4.7.5.	IL-6R-spezifisches RNA-Aptamer als DNA-Variante.....	70
4.7.6.	Einfluss der Anzahl an postulierten G-Tetraden auf die Aptamerbindung .....	71
4.7.7.	Einfluss von Magnesiumionen auf die Aptamerbindung.....	72

## Inhaltsverzeichnis

4.7.8.	Einfluss von monovalenten Kationen auf die Aptamerbindung .....	73
4.8.	Zirkulardichroismus (CD) -Spektroskopie .....	75
4.9.	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und $K_d$ -Wert Bestimmung .....	77
4.10.	Verifizierung der Aptamer-Protein-Interaktion mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR).....	78
4.11.	Analyse der Bindung mittels Durchflusszytometrie .....	80
4.11.1.	Stabilitätstest der Aptamere in Serum-enthaltendem Medium.....	80
4.11.2.	Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen mittels RNA-Aptamer .....	80
4.11.3.	Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an IL-6R-tragende Zellen.....	81
5.	Diskussion .....	83
5.1.	Selektion IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere .....	83
5.2.	Verkürzung der IL-6R bindenden Aptamere 13-15 und 13-27 .....	87
5.3.	Kompetitionsstudien mit Liganden des IL-6R .....	88
5.4.	Charakterisierung der kurzen IL-6R-bindenden DNA-Aptamere .....	89
5.5.	CD-Spektroskopie und G-Quadruplexe.....	94
5.6.	Nachweis der Aptamerbindung mittels FCS und SPR .....	96
5.7.	Bindung der Aptamere an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen .....	97
6.	Ausblick .....	99
	Literaturverzeichnis.....	101
	Anhang .....	112
	Sequenzen der Klone.....	112
	Gefahrstoffsymbole .....	113
	Gefahrstoffinformationen.....	113
	Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I und II.....	114
	Danksagung.....	115
	Selbstständigkeitserklärung.....	117



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
CEACAM	Carcinoembryonaleszelladhäsions molekül
cpm	Zählimpulse pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria Broth
M	Molar

## Abkürzungsverzeichnis

mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat Puffer (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoffionen-Konzentration ( <i>potentia hydrogenii</i> )
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
s	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor ( <i>soluble</i> )
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>Taq</i>	Thermus Aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
W	Watt

## Kurzfassung

Das Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, welches bei vielen biologischen Vorgängen, beispielsweise bei der Regulation von Immunantworten, Entzündungsreaktionen und der Hämatopoese, eine essentielle Rolle spielt. IL-6 stimuliert verschiedene Zielzellen über seinen Rezeptorkomplex bestehend aus zwei Rezeptoruntereinheiten, dem IL-6-Rezeptor (IL-6R) und dem Glykoprotein gp130. Eine Dysregulation der Zytokin-Produktion geht mit einer Vielzahl an Erkrankungen, z. B. der Rheumatoiden Arthritis, einher. Die Hemmung der IL-6-vermittelten Signaltransduktion stellt somit eine potentielle Anti-Zytokin-Therapie dar.

Eine zur Antikörper-Therapie alternative Strategie könnte die Anwendung von Aptameren bieten. Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren, die ihre Zielmoleküle hoch affin und spezifisch binden. Deren vorteilhafte Eigenschaften Antikörpern gegenüber, prädestinieren sie für den Einsatz als Therapeutika.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für den löslichen IL-6R (sIL-6R), einer IL-6R-Variante ohne zytoplasmatischer und transmembraner-Domäne. In einem *in vitro* Evolutionsprozess (SELEX = Systematische Evolution von Liganden über EXponentielle Anreicherung) konnten fünf IL-6R-spezifische Aptamere isoliert werden (101 nt), die eine gemeinsame G-reiche Konsensussequenz aufwiesen. Zwei dieser Aptamere wurden in Filterbindungsstudien detailliert analysiert. Es konnten Dissoziationskonstanten zwischen 200 nM und 500 nM ermittelt werden. Aptamer-Varianten, die auf das G-reiche 16 bis 18 Nukleotid-lange Konsensusmotiv minimiert wurden, zeigten vergleichbare Affinitäten und Spezifitäten für sIL-6R. Die Aptamere interagierten mit keinem anderen getesteten Protein. Zur weiteren Verifizierung der Aptamer-Protein-Interaktionen wurden die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) sowie die Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR) angewandt. Mit Hilfe beider Methoden konnte die Affinität der Aptamere zum Rezeptor bestätigt werden. Kompetitionsstudien führten zu dem Ergebnis, dass die Aptamere nicht mit den natürlichen IL-6R-Liganden, IL-6 und gp130, kompetieren.

Das konservierte Bindemotiv wies eine vierfache Wiederholung der Basenabfolge GGGT auf. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Aptamere G-Quadruplexe als stabilisierende Struktur motive ausbilden. Mutationsanalysen und CD-spektroskopische Aufnahmen bestätigten dies. Eine Bindung der DNA-Aptamere an den nativen Rezeptor, auf der Oberfläche IL-6R-tragender-Zellen, konnte durchflusszytometrisch nicht gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte die rasche Dissoziationsrate sein, die mittels SPR ermittelt wurde.

## Kurzfassung

Zukünftig bleibt zu klären, ob die IL-6R-spezifischen Aptamere lediglich eine markierende Funktion besitzen oder aber Potenzial für eine *in vivo* Applikation haben, in dem sie beispielsweise die Wirkung des Rezeptors blockieren oder als Vehikel für eine Zelltyp-spezifische Aufnahme verschiedener therapeutischer Wirkstoffe, wie Toxine oder Nanopartikel, fungieren.

## Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine which plays a pivotal role in immune responses, inflammation, and hematopoiesis. IL-6 acts on a variety of target cells via the ligand-binding receptor subunit IL-6R and the signal transducing subunit gp130. In various diseases, for example rheumatoid arthritis, elevated IL-6 levels were observed, promoting the progression and pathology of these diseases. The inhibition of the IL-6 signaling pathway seems to be a potential useful therapeutic strategy.

One possible anti-antibody strategy could be the application of aptamers. Aptamers are short single-stranded nucleic acids with a defined three-dimensional shape, which allows them to bind target molecules with high affinity and specificity.

This thesis reports on the development of DNA aptamers with affinity for the IL-6R. The use of an *in vitro* selection process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) enabled the isolation of five IL-6R specific aptamers (101 nt) featuring a common G-rich consensus motif. Two of them were analyzed in detail via filterbinding assays. The measured dissociation constants were in the range of 200 nM to 500 nM. Aptamer variants limited to the 16-18 nt long G-rich motif showed the same affinity and specificity. Additionally, aptamer-protein interactions were verified by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and surface plasmon resonance (SPR).

The aptamers did not compete with the natural IL-6R ligands IL-6 and gp130. The characteristic GGGT repeats in the conserved motif led to the assumption that stable G-quadruplex structures were formed. Mutation analysis and CD-spectroscopy confirmed this. Flow cytometry experiments revealed no binding of aptamers to cells carrying the IL-6 receptor on their surface.

In the future it remains to be determined, whether the IL-6R specific aptamers could be used as a novel therapeutic tool blocking IL-6R functions or drug-delivery vehicles in *in vivo* applications.

# 1. Einleitung

## 1.1. Zytokine

Zytokine sind körpereigene Botenstoffe, die neben Hormonen zu den humoralen Mediatoren zählen [1]. Sie werden nach entsprechender Stimulation von einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten sowie von B- und T-Zellen sekretiert [1]. Zu ihren Aufgaben gehört beispielsweise die Steuerung von Immunantworten, die Regulation der Zellproliferation, der Hämatopoese, des Tumorwachstums und Entzündungsreaktionen. Dabei entfalten Zytokine ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Die Rezeptoren der meisten Zytokine setzen sich aus einer ligandenbindenden und einer signaltransduzierenden Untereinheit zusammen [2].

Zu den Zytokinen zählt man Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren sowie Tumornekrose-Faktoren (TNF) und Chemokine. Sie werden in pro-inflammatorisch- und anti-inflammatorisch-wirkende Proteine unterteilt.

### 1.1.1. Das Interleukin-6 (IL-6)

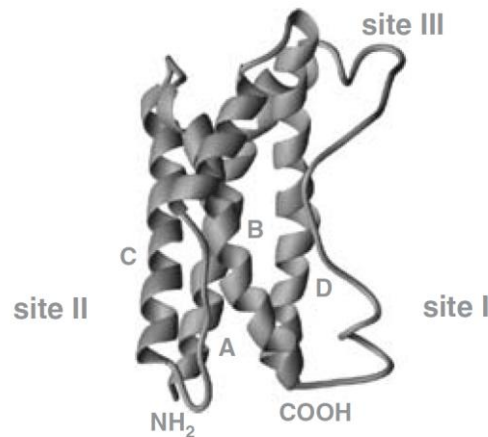
Das Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin mit einem weiten Spektrum an biologischen Aktivitäten, insbesondere während Entzündungsreaktionen [3]. Das Wirkungsspektrum des IL-6 auf verschiedene Zellen ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Interleukin-6 spielt beispielsweise eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und der Induktion von Akut-Phase-Proteinen, wie dem Fibrinogen oder dem C-reaktiven Protein [3, 4]. IL-6 wird nach Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide, virale Nukleinsäuren oder Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$  und  $\gamma$ -Interferon) von verschiedenen Zellen produziert [5, 6]. Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen sind dabei als Hauptproduzenten des IL-6 zu nennen [7].

**Tab. 1.1: Wirkung des Interleukin-6 (IL-6) auf verschiedene Zielzellen (aus [3, 7]).**

Zielzellen	Wirkung
B-Zellen	Differenzierung zu Immunglobulin sezernierenden Zellen
T-Zellen	Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen
Makrophagen, Megakaryozyten	Differenzierung
hämatopoetische Stammzellen	Reifung und Differenzierung
Hepatozyten	Induktion von Akut-Phase-Proteinen
Neuronen	Differenzierung
Plasmozytom- und Myelomzellen	Wachstumsfaktor und Differenzierung

## 1. Einleitung

Nach Abspaltung des Signalpeptids besteht das reife humane Interleukin-6 aus 184 Aminosäuren und gehört zur 4-Helix-Bündel-Gruppe mit vier charakteristischen antiparallelen Helices (Abb. 1.1; [8]). IL-6 stimuliert seine Zielzellen durch Bindung an seinen Rezeptor und weist hierfür drei potentielle Bindungsstellen auf: *site I, II und III*.



**Abb. 1.1: Dreidimensionale Struktur des humanen Interleukin-6 (IL-6) [8].** Dargestellt ist die Tertiärstruktur des IL-6 mit dessen drei potentiellen Interaktionsstellen für seine Rezeptoren (site I für IL-6R, II und III für gp130). Gekennzeichnet sind die Termini sowie die vier  $\alpha$ -Helices (A, B, C, D).

### 1.1.2. Der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R)

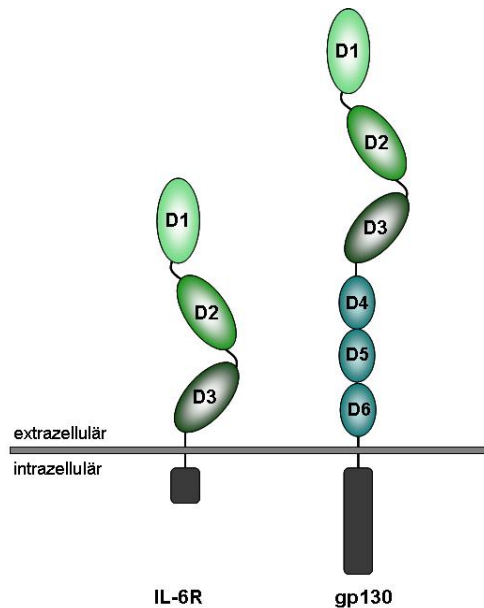
Die Signaltransduktion in Zielzellen als Folge einer Zytokin-Stimulation erfordert die Bindung des Interleukins an seine Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche.

Der Interleukin-6-Rezeptor-Komplex besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, einer ligandenbindenden  $\alpha$ -Untereinheit (IL-6-Rezeptor), die IL-6 bindet, und einer signaltransduzierenden  $\beta$ -Untereinheit (gp130), die nach Bindung des IL-6/IL-6R-Komplexes das Signal in die Zelle weiterleitet [9].

Die cDNA des humanen IL-6R kodiert für ein Vorläuferprotein bestehend aus 468 Aminosäuren, das sich aus einem Signalpeptid (19 AS), einer extrazellulären Region (339 AS), einer Transmembran-Domäne (28 AS) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (82 AS) zusammensetzt. Der reife 80 kDa große IL-6R (auch gp80 genannt) stellt die glykosylierte Form des 50 kDa Precursor-Proteins dar [10]. Der strukturierte extrazelluläre Bereich des Rezeptors ist durch drei Domänen charakterisiert: D1, D2 und D3 (Abb. 1.2). Die N-terminale Domäne D1, eine Immunglobulin-ähnliche Domäne, die an der Formierung des aktiven Rezeptor-Komplexes nicht beteiligt ist, spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität des Proteins [11]. D2 und D3 sind Zytokin-bindende Domänen (CBD), die für die Interaktion mit

## 1. Einleitung

dem Liganden IL-6 (Abb. 1.7; site I) und der zweiten Rezeptoruntereinheit gp130 verantwortlich sind [12].



**Abb. 1.2: Der Interleukin-6-Rezeptor und das Glykoprotein gp130 (aus [13]).** Dargestellt sind die Domänen der Rezeptoruntereinheiten IL-6R (links) und gp130 (rechts). Extrazellulär: D1: N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne, D2 und D3: Zytokin-bindende Domänen (CBD) [12]. Gp130 besteht zusätzlich aus drei, Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen (D4-D6) [11]. An die extrazelluläre Region schließen sich je eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne an.

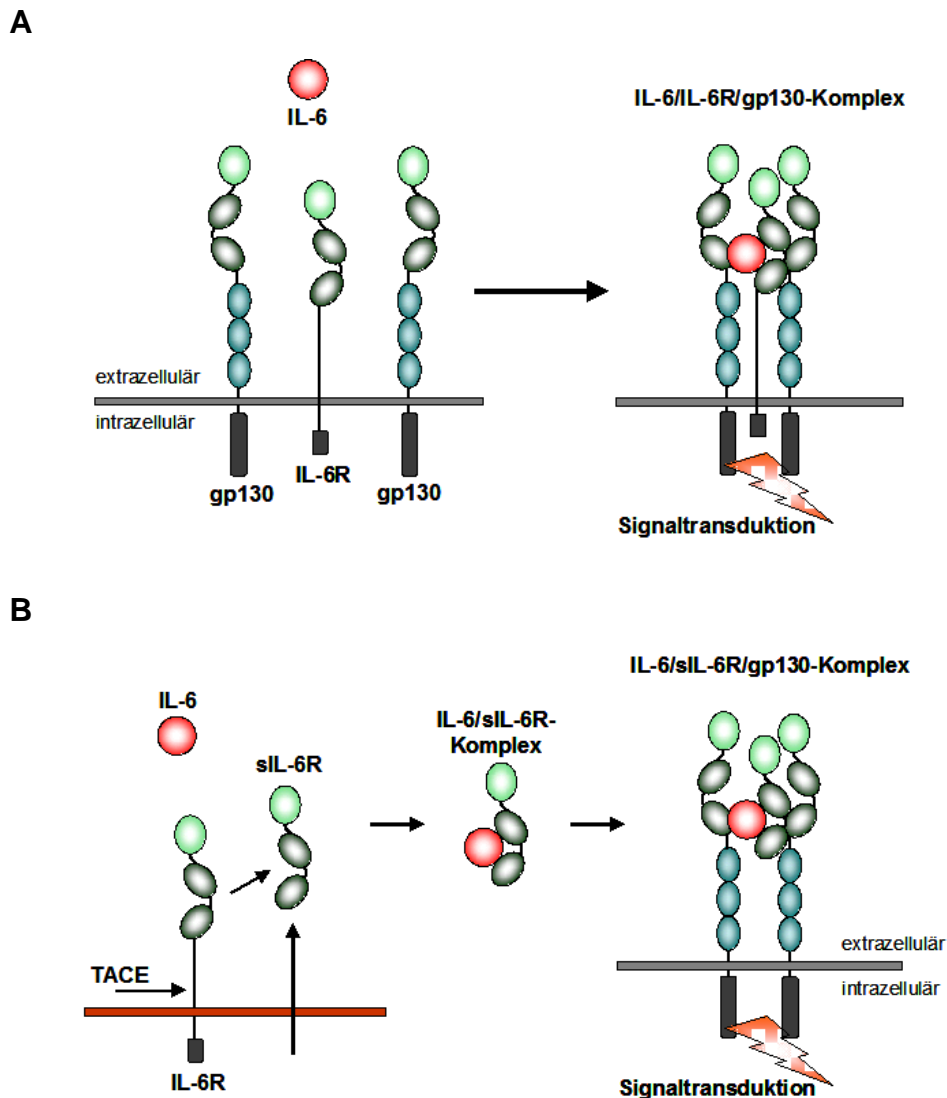
Das Interleukin-6 (IL-6) bindet zunächst an den IL-6-Rezeptor (IL-6R) mit einer Affinität von 1 nM [14]. Dieser IL-6/IL-6R-Komplex bindet und aktiviert folgend ein Homodimer der zweiten Rezeptoruntereinheit gp130 (Abb. 1.2), wodurch das IL-6-vermittelte Signal in die Zelle weitergeleitet wird. Dieser Mechanismus der Signaltransduktion wird als klassisches *IL-6-Signaling* bezeichnet (Abb. 1.3, A) [15]. Zytokine, wie IL-11, Oncostatin-M, Neuropoietin und IL-21, aktivieren ihre Zielzellen ebenfalls durch die signaltransduzierende Untereinheit gp130 [8]. Während das gp130 von fast allen Körperzellen exprimiert wird, beschränkt sich die Expression des IL-6R auf Hepatozyten und einigen Lymphozyten, wie Monozyten, Neutrophile, T- und B-Zellen [8, 16]. Zellen ohne den membrangebundenen IL-6R können über einen alternativen Mechanismus, das sogenannte *IL-6-Trans-Signaling*, auf eine IL-6-Stimulation reagieren (Abb. 1.3, B).

Neben dem membrangebundenen IL-6R existiert eine lösliche Form des Proteins (sIL-6R). Diese wird hauptsächlich durch limitierte Proteolyse, einem als „*Shedding*“ bezeichnetem Prozess, freigesetzt [17]. Als verantwortliche Proteasen wurden die membranständigen Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 oder TACE (ADAM, *A Disintegrin and Metalloproteinase*) identifiziert [18, 19]. Der sIL-6R kann aber auch durch Translation einer alternativ gepleißten mRNA generiert werden [20]. Der sIL-6R bindet seinen Liganden IL-6



## 1. Einleitung

mit zum membrangebundenem IL-6R vergleichbarer Affinität [19]. Der Bindung von IL-6 an den sIL-6R folgt die Interaktion mit dem gp130-Homodimer (Abb. 1.3, B), wodurch wie bei dem membranständigen IL-6R die Signalkaskade ausgelöst wird.

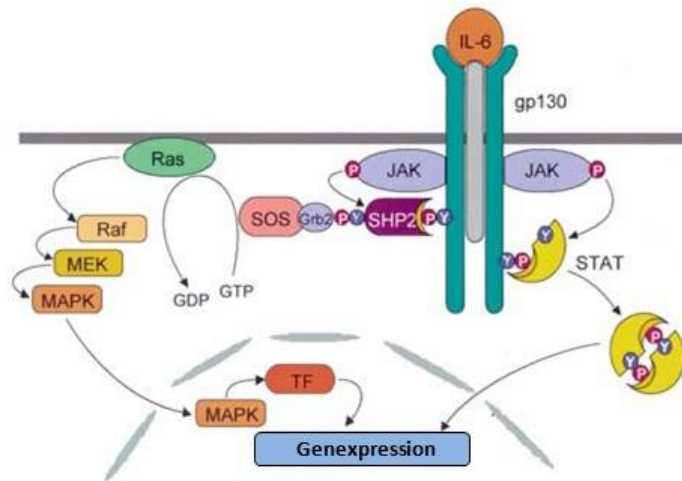


**Abb. 1.3: Klassisches IL-6-Signaling und IL-6-Trans-Signaling (aus [13]).** A) Klassisches IL-6-Signaling: Der Komplex aus IL-6 und membrangebundenem IL-6R bindet und aktiviert ein gp130-Homodimer, wodurch die Signalkaskade ausgelöst wird. B) IL-6-Trans-Signaling: Der membrangebundene IL-6R wird durch alternatives Spleißen oder limitierter Proteolyse (Metalloprotease TACE) in die lösliche Form überführt. Der IL-6/sIL-6R-Komplex interagiert mit gp130, so dass eine IL-6-vermittelte Stimulation von Zellen ohne membranständigen IL-6R möglich wird (nach [15]).

Mit dem zytoplasmatischen Teil von gp130 sind konstitutiv Janus-Tyrosinkinasen (JAK1, JAK2 und TYK2) assoziiert, die durch die Homodimerisierung von gp130 aktiviert werden und intrazelluläre Tyrosinreste von gp130 phosphorylieren. Diese Phosphotyrosinreste dienen als Bindungsstellen für die STAT1- und STAT3-Faktoren (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), wo sie schließlich durch die JAKs phosphoryliert werden. Die phosphorylierten STAT-Proteine bilden Homo- und Heterodimere, die in den Nukleus

## 1. Einleitung

einwandern und dort die Transkription verschiedener Zielgene regulieren (Abb. 1.4) [16, 21]. Neben STAT-Proteinen werden weitere Transkriptionsfaktoren, wie NF-IL-6 (*Nuclear Factor IL-6*), über die Ras-Raf-Signalkaskade bzw. Ras-abhängige MAP-Kinase-Kaskade aktiviert.



**Abb. 1.4: IL-6-vermittelte Signalkaskaden [21].** Der IL-6/IL-6R-Komplex interagiert mit gp130 und induziert dessen Homodimerisierung. Diese Aktivierung löst die Jak/STAT- sowie Ras/Raf/MAP-Kinase-Kaskaden aus. Erläuterungen siehe Text.

Der aktive Rezeptorkomplex ist ein Tetramer, bestehend aus zwei Molekülen gp130 und jeweils einem Molekül IL-6 und IL-6R [11]. Bei hohen IL-6/IL-6R-Konzentrationen wird ein zweiter IL-6/IL-6R-Komplex von dem aktiven Tetramer gebunden, was zur Formierung eines inaktiven hexameren Signaltransduktionskomplexes führt [11, 19].

Eine Dysregulation der sIL-6R- bzw. der IL-6-Produktion geht mit einer Vielzahl an Erkrankungen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis (RA), einher [16, 22]. Die RA ist eine chronisch inflammatorische Autoimmunerkrankung, bei der die Gelenkknorpel und die Knochensubstanz der Gelenke zerstört werden. Eine neuartige Therapiemöglichkeit bietet Tocilizumab (Actemra, MRA), ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den IL-6R [23, 24]. Tocilizumab bindet sowohl den löslichen als auch den membrangebundenen IL-6-Rezeptor und inhibiert so die IL-6-vermittelte Signaltransduktion. Das Medikament wurde Anfang 2009 zur Behandlung der RA eingeführt und stellt die einzige, klinisch getestete Anti-Zytokin-Therapie dar [25]. Obwohl die Therapie mit Tocilizumab effektiv und erfolgreich ist, wird sie mit schweren Nebenwirkungen begleitet. Eine alternative Strategie zur selektiven Inhibierung des IL-6-Signalwegs böte die Anwendung von sIL-6R-Antagonisten wie beispielsweise sgp130. Die lösliche Form des gp130 (sgp130) entsteht durch alternatives Spleißen und kann selektiv die IL-6-Signale, die durch den sIL-6R vermittelt werden, nicht aber die durch den membranständigen IL-6R, hemmen [19].

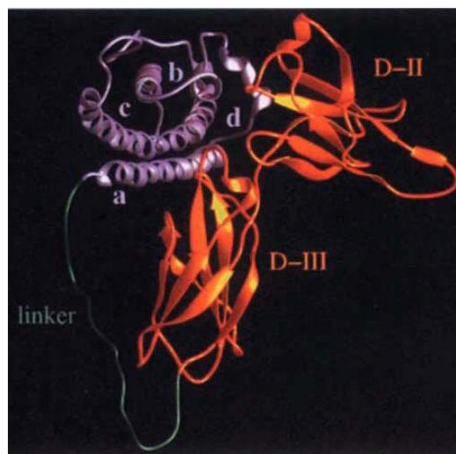
## 1. Einleitung

### 1.1.3. Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität des IL-6/IL-6R-Komplexes wurde im Jahre 1997 von Fischer *et al.* ein bioaktives Fusionsprotein aus humanem IL-6 und dem löslichen IL-6R generiert und als Hyper-IL-6 bezeichnet [14]. Dazu wurde der verkürzte COOH-Terminus des sIL-6R über einen an Glycin und Serin reichen 13 AS langen, flexiblen Polypeptidlinker mit dem NH<sub>2</sub>-Terminus von IL-6 verbunden (Abb. 1.5).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten superagonistische Aktivitäten für Hyper-IL-6 nachgewiesen werden [26]. Hyper-IL-6 ist in der Lage, Zellen die gp130, nicht aber den IL-6R exprimieren, zu stimulieren. Die Aktivierung der gp130-Rezeptoruntereinheit durch das Designer-Zytokin konnte in verschiedenen Zellen, wie die hämatopoietischen Vorläuferzellen, Endothelzellen und Hepatozyten, gezeigt werden.

In gp130 exprimierenden Zellen zeigte das Hyper-IL-6 in bis zu 1000-fach niedrigeren Konzentrationen als der nicht kovalent gebundene IL-6/IL-6R-Komplex, biologische Aktivität [14]. Im Mausmodell konnte nach Injektion des Hyper-IL-6 eine verstärkte und längere Akute-Phase-Antwort beobachtet werden als bei Mäusen, denen eine 10-fach höhere Dosis an IL-6 alleine injiziert wurde. Einen ähnlichen Effekt hatte das Hyper-IL-6 auch auf menschliche Hepatomzellen. Untersuchungen von Peters *et al.* zeigten, dass die länger anhaltende Aktivität des Hyper-IL-6 auf eine weniger effiziente Internalisierung zurückzuführen ist [26]. Durch diese Eigenschaften wäre der Einsatz von Hyper-IL-6 bei therapeutischen Ansätzen denkbar.



**Abb. 1.5: Dreidimensionales Modell des Hyper-IL-6 [14].** Hyper-IL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 (lila) und sIL-6R (rot). Der N-terminale Rest des IL-6 wurde kovalent über einen 13 AS langen Peptidlinker an den C-Terminus des verkürzten sIL-6R gebunden. a,b,c,d: vier antiparallele  $\alpha$ -Helices des IL-6; D-II und D-III: Zytokin-bindende Domänen des sIL-6R.

## 1. Einleitung

### 1.2. Aptamere

Als Aptamere werden kurze einzelsträngige Nukleinsäuren (DNA oder RNA) bezeichnet, die hoch affin und spezifisch an ihre Targetmoleküle binden. In der Regel werden Aptamere durch einen zyklischen *in vitro* Selektionsprozess namens SELEX aus einer kombinatorischen Bibliothek mit einer Sequenzdiversität bis zu  $10^{15}$  Molekülen generiert. Der Begriff „Aptamer“ leitet sich vom lateinischen „aptus“ für passend und dem griechischen „meros“ für Teil ab, welcher 1990 von Ellington und Szostak eingeführt wurde [27]. Sie bezeichneten damit, durch *in vitro* Selektion isolierte RNA-Moleküle, die bestimmte organische Farbstoffe binden konnten. Die Ausbildung einer definierten dreidimensionalen Struktur befähigt Aptamere mit ihren Zielmolekülen zu interagieren. Heute ist es möglich Aptamere für fast jedes Target zu selektieren [28]. So sind bislang mehr als einhundert Aptamere für verschiedene Targets, wie z. B. Farbstoffe, Aminosäuren, Antibiotika, Peptide, Proteine, Viren und sogar ganze Zellen selektiert worden (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2: Beispiele für Zielmoleküle und dafür selektierte Aptamere.**

Zielgruppe	Target	Aptamer	$K_d$ -Wert [M]	Quelle
Ionen	$Zn^{+}$	DNA	$1,5 \times 10^{-5}$	[29]
Fluorophore	Sulforhodamin B	DNA/RNA	n.b./ $3,1 \times 10^{-7}$	[30, 31]
Nukleotide	Adenosintriphosphat (ATP)	DNA/RNA	$6,0 \times 10^{-6}$ /n.b.	[32, 33]
Aminosäuren	Arginin	DNA	n.b.	[34]
Antibiotika	Daunomycin/Oxytetracyclin	DNA	$2 \times 10^{-8}$ / $1 \times 10^{-8}$	[35, 36]
	Moenomycin A	RNA	$3,0 \times 10^{-7}$	[37]
Peptide	Neuropeptid Y (NPY)	DNA	$0,3-1,0 \times 10^{-6}$	[38]
Proteine	Humanes $\alpha$ -Thrombin	DNA	$2,5 \times 10^{-8}$	[39]
	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	2' mod RNA	$0,5 \times 10^{-10}$	[40, 41]
Toxine	Rizin	DNA	$6 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-7}$	[42]
Zellen	Burkitt-Lymphoma B-Zellen	DNA	$4,9 \times 10^{-8}$	[43]
Komplexe Strukturen	Trypanosomen	RNA	$6 \times 10^{-8}$	[44]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	DNA	n.b.	[45]
	<i>Bacillus anthracis</i> -Sporen	DNA	n.b.	[46]

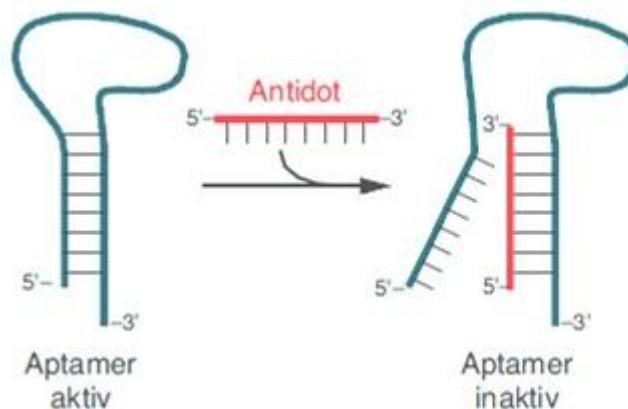
Aufgrund ihrer Eigenschaften finden Aptamere vielseitige Anwendungen, beispielsweise in der Grundlagenforschung als Werkzeuge für die Charakterisierung von Biomolekülen (Target-Validierung) und auf den Gebieten der Diagnostik und Therapie [47, 48].

## 1. Einleitung

### 1.2.1. Aptamere versus Antikörper

Aptamere können ähnlich wie Antikörper hoch affin und spezifisch ihre Zielmoleküle binden. Durch ihre Bindungseigenschaften stellen sie eine potente Alternative zu Antikörpern dar, vor allem im Bereich der klinischen Therapie [49]. In vielerlei Hinsicht bietet die Aptamer-Technologie Vorteile gegenüber der Antikörper-Therapie.

Einer der wahrscheinlich wichtigsten Vorteile ist, dass die Isolierung von Aptameren *in vitro* erfolgt, wobei die Selektionsbedingungen gezielt angepasst werden können und im Gegensatz zu der Antikörper-Herstellung kein biologisches System erfordert. Zudem lassen sich Aptamere kostengünstig in großen Mengen und hohem Reinheitsgrad chemisch synthetisieren. Aptamere zeigen keine Toxizität und nur sehr geringe Immunogenität [28, 50]. Die Stabilität von Aptameren und somit ihre Bioverfügbarkeit kann durch chemische Modifikationen erhöht werden. Aptamere werden durch Hitze nicht irreversibel geschädigt, sondern können renaturiert werden, was ihnen eine unbegrenzte Beständigkeit verleiht. Ein weiterer Vorteil gegenüber Antikörpern ist durch die Entwicklung von *Antisense*-Molekülen, den sogenannten Antidotes, die die Aktivität von Aptameren effizient inhibieren können, gegeben (Abb. 1.6 [47]).

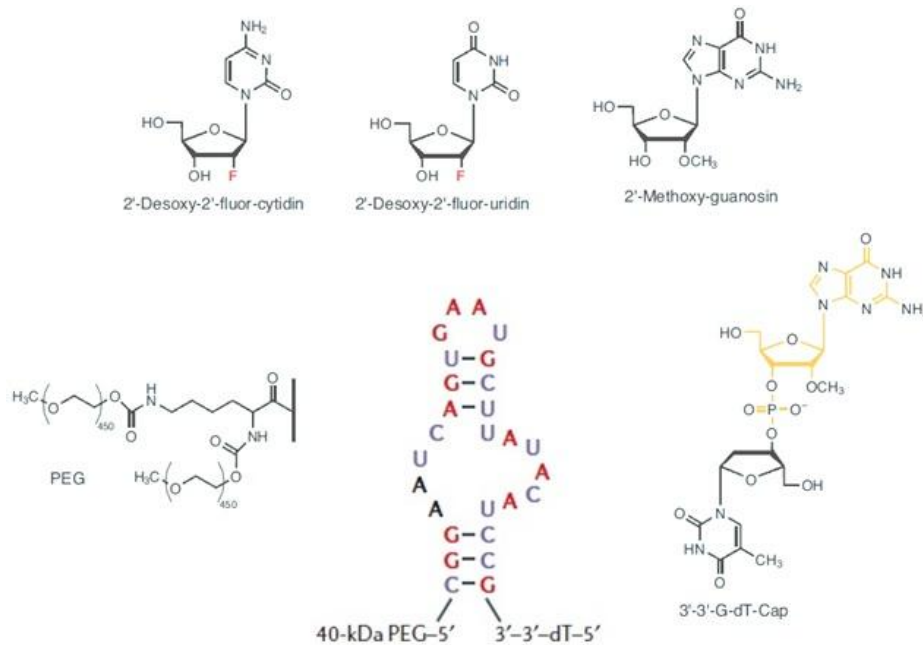


**Abb. 1.6: Verwendung von *Antisense*-Molekülen als Antidot für Aptamere [47].** *Antisense*-Moleküle können über komplementäre Basenpaarung an ihre Aptamere binden und so die Struktur und Funktion des Aptamers beeinträchtigen.

Im Vergleich zu Antikörpern ermöglicht ihnen ihre geringe Größe den Zugang zu ansonsten blockierten Protein-Epitopen [51]. Seit den 1990er Jahren haben Aptamere einen immer größeren Einfluss in der Biologie und Medizin erlangt. Zahlreiche Aptamere wurden für verschiedene therapeutische Targetmoleküle selektiert, von denen sich heute einige in (prä-)klinischen Studien befinden (Tab. 1.3). Das Potential der Aptamere als vielversprechende Molekülklasse neuartiger Therapeutika wird durch das erste im Jahre 2004 zugelassene Aptamer-basierte Medikament Pegaptanib (Macugen<sup>®</sup>) untermauert (Abb. 1.7).

## 1. Einleitung

Die relativ schlechte Pharmakokinetik, bedingt durch eine geringe Nukleaseresistenz und schnelle Nierenausscheidung waren limitierende Faktoren für eine *in vivo* Applikation. Das Problem des raschen Aptamerabbaus und die schnelle renale Resorption konnte durch gezielte chemische Modifikationen mit funktionellen Gruppen bewältigt werden [40, 50], wie in Abbildung 1.3 anhand des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-spezifischen Aptamers (Abbildung 1.7, Mitte) gezeigt.



**Abb. 1.7: Das Aptamer-basierte Therapeutikum Macugen<sup>®</sup> (verändert nach [47, 52]).** Gezeigt ist die Sequenz und Sekundärstruktur des anti-VEGF Aptamers Pegabtanib (Macugen<sup>®</sup>). 2'-Methoxypurine sind in rot und 2'-Desoxy-2'-fluoro-modifizierte Pyrimidinbasen in blau dargestellt. Mit Ausnahme zweier Adenine (schwarz) wurden alle 2'-OH-Gruppen der Purine post-selektiv durch 2'-Methoxy-Gruppen ersetzt. Am 5'-Terminus ist ein 40 kDa großer Polyethylenglykol-Linker (PEG) angefügt. Zum zusätzlichen Schutz vor Exonukleasen wurde das 3'-Ende mit einem 3'-3'-dT-Cap versehen.

Durch den Austausch des DNA-Phosphatrückgrats gegen Phosphorthioate, der Substitution der 2'-OH-Gruppe der Ribose eines RNA-Aptamers gegen eine Fluoro- oder Aminogruppe, oder durch das Anfügen einer dT-Kappe am 5'- oder 3'-Terminus der Aptamere kann deren Stabilität signifikant erhöht werden [28]. Diese Modifikationen können während der *in vitro* Selektion oder aber post-selektiv erfolgen. Allerdings können solche post-selektiven Modifikationen zur Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften der Aptamere führen [50]. Die Konjugation von Polyethylenglykol-Einheiten kann die Serumhalbwertszeit der Aptamere signifikant erhöhen und den Vorgang der renalen Ausscheidung verzögern [49, 52]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung Nuklease-resistenter Enantiomere, sogenannte Spiegelmerer [50].

## 1. Einleitung

Das erste und derzeit einzige Aptamer-basierte Medikament, ist das stark modifizierte RNA-Aptamer Pegaptanib (Macugen®). Es wird zur Behandlung der altersbedingten feuchten Makulardegeneration (AMD), einer Erkrankung des menschlichen Auges, eingesetzt [53]. Bei der Entstehung von AMD spielt der Wachstumsfaktor VEGF eine wichtige Rolle, was ihn zu einem geeigneten therapeutischen Targetmolekül machte. Bei Patienten mit AMD ist das Expressionsniveau des VEGF in dem retinalen Pigmentepithel sowie den Blutgefäßen der Aderhaut stark erhöht [47]. Durch alternatives *Splicing* entstehen verschiedene Isoformen des VEGF, wobei VEGF<sub>165</sub> die dominante, für pathogene Veränderungen im Auge verantwortliche Variante ist [52]. Das selektierte Aptamer bindet an VEGF<sub>165</sub> hoch affin und blockiert so die Interaktion des Wachstumsfaktors mit dessen Rezeptoren [53]. Die Therapie der AMD mittels Macugen® erfolgt durch direkte Injektion des Wirkstoffs ins Auge.

Wie oben bereits erwähnt, befinden sich derzeit weitere Aptamere in (prä-)klinischen Studien (Tab. 1.3). Beispielsweise seien hier das Quadruplex-ausbildende DNA-Aptamer AS1411 und das REG1 Aptamer zu nennen, die sich jeweils in Phase II der klinischen Studie befinden [50]. Erstes bindet an Nukleolin, einem multifunktionellem Protein, das stark von Tumorzellen sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird [54]. Die Bindung des Aptamers AS1411 an Nukleolin führt zu einer Anti-Proliferationsantwort, die mit einer drastischen Reduktion von Tumoren einhergeht. Zukünftig soll das Aptamer in der Therapie von Nieren- und Lungenkrebs eingesetzt werden. Die Anwendung von Aptameren als Antikoagulation spielt beispielsweise eine wichtige Rolle bei operativen Eingriffen um die Koagulation des Blutes zu verhindern. So ist REG1 ein bivalentes Aptamer aus RB006 und RB007, das den Blutgerinnungsfaktor IXa erkennt und inhibiert.

**Tab. 1.3: Einige therapeutische Aptamere in (prä-) klinischen Studien [48, 50].**

Aptamer	Zielmolekül	Indikationsgebiet
AS1411	Nukleolin	Nieren- und Lungenkrebs, akute myeloische Leukämie (AML)
REG1 (RB006/RB007)	Faktor IXa	aortokoronaler Bypass (CABG)
NU172	Thrombin	aortokoronaler Bypass (CABG)
ARC1779	Von-Willebrand-Faktor	akutes Koronarsyndrom (ACS)
Pegaptanib (Macugen®)	VEGF <sub>165</sub>	diabetische Retinopathie (seit 2004 für die AMD zugelassen)

Das Anwendungspotential von Aptameren, vor allem für deren *in vivo* Applikationen, ist von deren Stabilität und Nuklease-Resistenz abhängig. Die Formierung Strukturstabilisierender

## 1. Einleitung

Motive, wie beispielsweise G-Quadruplex-Strukturen, spielt dabei eine zentrale Rolle und verleiht diesen Aptameren im Vergleich zu unstrukturierten Nukleinsäuren eine deutlich höhere Serumhalbwertszeit [54], was sie zu besonders interessanten Molekülen in der Anti-Krebs-Therapie macht [55, 56].

### 1.2.2. G-Quadruplexe

Guaninreiche Nukleinsäuren können aufgrund der Selbstorganisation von Guanosinresten komplexe Tertiärstrukturen, sogenannte Quadruplexe, ausbilden. Ein G-Quadruplex ist eine lipophile, viersträngige Struktur, die durch die Interaktion mehrerer gestapelter Guanin-Tetraden (auch G-Quartette) entsteht [57]. Die Formierung dieser stabilisierenden Struktur motive verleiht den Nukleinsäuren ungewöhnliche biophysische und biologische Eigenschaften [54]. Im Gegensatz zu unmodifizierten aber auch terminal-modifizierten nicht-Quadruplex-Nukleinsäuren sind G-Quadruplexe wesentlich stabiler, resistent gegenüber nukleolytischem Abbau und bleiben selbst mehrere Tage in Serum-enthaltenden Medien intakt [54]. Der G-Quadruplex wird durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen der G-Quartette, Kation-Dipol-Wechselwirkungen, Stapelwechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen Nukleobase und Ionen zusammengehalten und stabilisiert [57, 58]. Derzeit sind eine Vielzahl solcher G-reichen Quadruplex-ausbildenden Aptamere für verschiedene Targetmoleküle selektiert worden (Tab. 1.4).

**Tab. 1.4: G-reiche DNA-Aptamere, deren Sequenz und Targetmoleküle.**

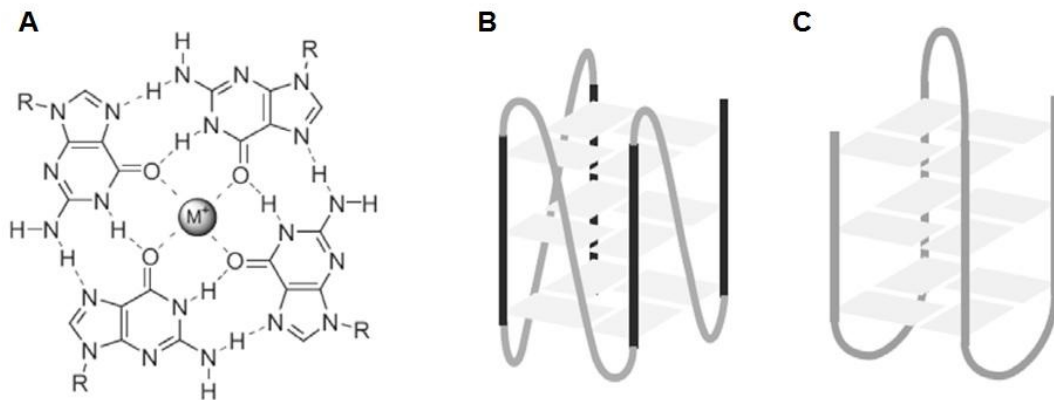
Aptamer	Targetmolekül	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Quelle
DNA (TBA)	Humanes Thrombin	GGTTGGTGTGGTTGG	[39, 59]
DNA (T30695)	HIV-1-Integrase	GGGTGGGTGGGTGGGT	[60, 61]
DNA	ATP	CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG	[32]
DNA	Sulforhodamin B	GGGTGGGAGGGAGGG	[30]
DNA	Hematoporphyrin	ATGGGGTCGGGCGGGCCGGGTGTC	[62]
DNA	Ethanolamin	GAGGT/CGGGTGGGTGGGT	[63]
DNA (AS1411)	Nukleolin	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG	[54, 64]

Durch die Selbstorganisation von Guaninen entsteht ein ebener Makrozyklus, der von acht Wasserstoffbrücken zwischen vier Guaninresten zusammengehalten wird (Abb. 1.8, A). Zusätzlich wird durch ein zentrales Kation, besonders durch  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ionen diese Struktur stabilisiert [57]. Das achtfach koordinierte Kation befindet sich zwischen zwei G-Quartetten und geht mit acht Sauerstoffatomen Kation-Dipol-Wechselwirkungen ein. Somit werden die wasserstoffverbrückten G-Quartette stabilisiert und die Basenstapelwechselwirkung verstärkt.



## 1. Einleitung

Die Kationen-Selektivität wird durch die Hydratationsenergie des Ions bestimmt. Dadurch, dass Kalium-Ionen leichter zu hydratisieren sind werden diese bevorzugt [65].

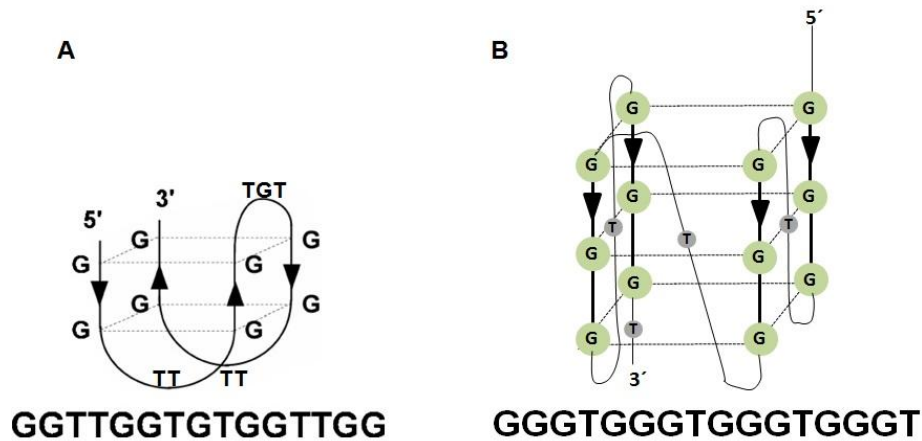


**Abb. 1.8: Struktur eines G-Quartetts und Topologien der Quadruplexe ([66]).** A) Schematische Darstellung eines G-Quartetts. Vier Guaninbasen wechselwirken miteinander über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken. Zusätzlich wird die Struktur durch ein zentrales Kation stabilisiert ( $M^+$ ). Die Riboseeinheiten sind als R gekennzeichnet. Formierung eines G-Quadruplexes in der B) *all*-parallelen Konformation bzw. der C) *anti*-parallelen Konformation.

G-Quadruplexe können aus einem (Monomer), zwei (Dimer) oder vier (Tetramer) separaten G-reichen Nukleinsäure-Strängen formiert werden [67, 68]. Im Gegensatz zu den di- und tetramolekularen Quadruplexen formieren sich intramolekulare Quadruplexe schneller und können verschiedene Konformationen eingehen (Abb. 1.8, B und C). Je nach Orientierung des Strangs spricht man von einer *all*-parallelen oder einer *anti*-parallelen Konformation.

G-Quadruplexe weisen eine mehrfache Wiederholung von Guanin-Abfolgen (G-Trakt) auf, die durch andere Nukleobasen (aber auch Guaninen) voneinander getrennt werden (Schleifen oder Loops). Die Anzahl der gestapelten G-Tetraden wird durch die Zahl der Guaninreste in den G-Abfolgen, die an der Ausbildung der G-Quartette beteiligt sind, bestimmt. Beispiele für die Bildung eines zweistöckigen bzw. dreistöckigen G-Quadruplexes, sowie die Formierung unterschiedlicher Konformationen sind anhand der am besten untersuchten Quadruplex-ausbildenden Aptamere TBA (Thrombin-bindendes Aptamer) und T30695 (einem HIV-1-Integrase Inhibitor) in Abbildung 1.9 dargestellt. Die Länge der Loops und deren Sequenz spielen eine wichtige Rolle bei der Art der Faltung und Stabilität der G-Quadruplexe [69]. G-reiche Oligonukleotide mit einzelnen T-Loops bilden sehr stabile Quadruplexe aus und präferieren die *all*-parallele Konformation [66, 70].

## 1. Einleitung



**Abb. 1.9: G-Quadruplex-ausbildende DNA-Aptamere.** **A)** Schematische Darstellung des Thrombin-bindenden Aptamers (TBA). Das TBA formiert einen zweistöckigen G-Quadruplex in der *anti*-parallelen Konformation (aus [71]). **B)** Das HIV-1-Integrase bindende DNA-Aptamer T30695 unter Ausbildung eines G-Quadruplexes bestehend aus drei übereinander gestapelten G-Quartetten in der *all*-parallelen Konformation (nach [61]).

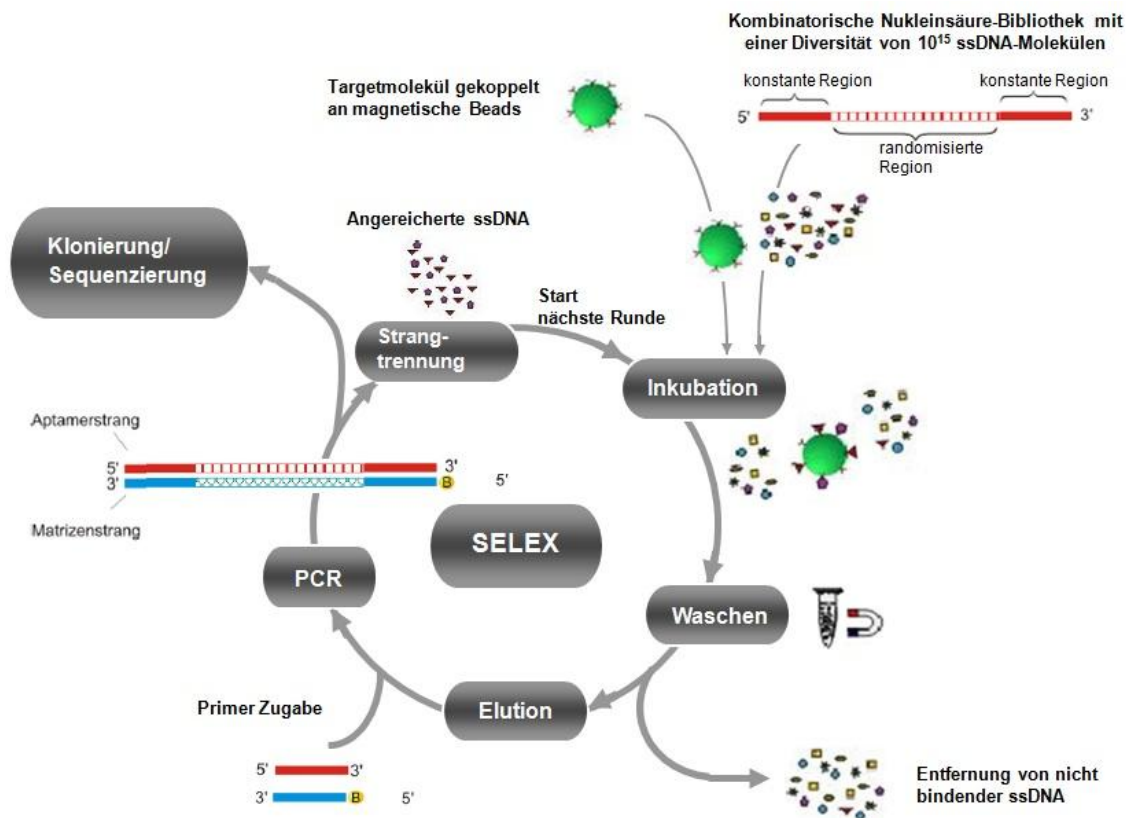
Neben einem gehäuften Vorkommen von G-Quadruplexen als stabilisierende Struktur motive in Aptamern, wurden diese ebenfalls an den Enden der DNA-Telomere sowie in Genpromotorregionen, wie die Promotoren des c-MYC, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , k-ras, Bcl-2 und c-kit gefunden [70, 72]. Die menschlichen Telomere bestehen aus Tausenden sich wiederholenden Einheiten der Sequenz 5'-TTAGGG-3'. Man nimmt an, dass der einzelsträngige 3'-Überhang dieser repetitiven Einheiten stabile intramolekulare G-Quadruplexe *in vivo* ausbilden [68] und somit die Telomerase inhibieren kann [57]. Die Formierung solcher Quadruplex-Strukturen in Promoterregionen verhindert die Bindung der RNA-Polymerase was zu einer Reduktion der Transkription führt [70]. Schätzungsweise sollen mehr als 370.000 weitere potentielle Quadruplex-ausbildende Sequenzen im menschlichen Genom existieren [73].

### 1.3. *In vitro* Selektion

Studien über die Anreicherung kleiner Nucleinsäuren mit definierten Funktionen (sogenannter Aptamere), basierend auf einem evolutiven Prozess, wurden 1990 etwa zeitgleich von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander publiziert. Ellington und Szostak isolierten RNA-Aptamere, die verschiedene organische Farbstoffe binden konnten [27]. Tuerk und Gold gelang es, RNA-Moleküle mit Spezifität für die DNA-Polymerase des T4-Bakteriophagen zu selektieren [74]. Die dritte Studie von Robertson und Joyce beschrieb die Anreicherung eines neuen katalytisch aktiven Ribozyms, welches die Spaltung von DNA-Substraten gegenüber einzelsträngiger RNA, im Vergleich zum Wild-Typ Enzyms präferierte [75]. Für diesen kombinatorischen *in vitro* Selektionsprozess wurde das Akronym **SELEX** (Systematische Evolution von Liganden durch Exponentielle Anreicherung) von Tuerk und Gold (1990)

## 1. Einleitung

eingeführt [74]. Ausgehend von einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek werden in einem zyklischen Prozess, Nukleinsäuren (Aptamere) iterativ angereichert, die an ein Targetmolekül spezifisch binden. Ursprünglich wurde das Verfahren der *in vitro* Selektion für RNA-Moleküle beschrieben, doch mit leichten Veränderungen war es auch für die Selektion von DNA-Aptameren anwendbar [39, 76]. Der Ablauf einer *in vitro* Selektion von DNA-Aptameren ist in Abbildung 1.10 dargestellt.



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.** *In vitro* Selektion zur Anreicherung von DNA-Aptameren für ein an magnetische Partikel gekoppeltes Targetmolekül. Zu Beginn der SELEX wird die synthetische ssDNA-Bibliothek mit dem an magnetischen Partikeln immobilisierten Zielmolekül inkubiert. Durch magnetische Separation und stringentes Waschen werden ungebundene ssDNA-Moleküle abgetrennt und anschließend durch Erhitzen die bindenden DNA-Moleküle eluiert. Die einzelsträngigen DNA-Moleküle werden mittels PCR amplifiziert und anschließend einer Strangtrennung unterzogen. Auf diese Weise wird die angereicherte Ausgangsbibliothek für den nächsten SELEX-Zyklus generiert. Nach 6-20 iterativen Zyklen kann die angereicherte Bibliothek kloniert und sequenziert werden. Modifiziert nach [77].

Das Darwinsche Prinzip ist Grundlage dieses zyklischen SELEX-Prozesses, welches dem Verlauf der natürlichen Evolution, d.h. einer Abfolge von Mutation, Selektion und Replikation, ähnelt [74]. Die iterativen Zyklen der *in vitro* Selektion setzen sich dem folgend aus drei Schritten zusammen: der Inkubation der Nukleinsäure-Bibliothek mit dem Zielmolekül, der Abtrennung gebundener von ungebundenen Nukleinsäurespezies und schließlich der Amplifikation der bindenden Nukleinsäuren. Ausgangspunkt des SELEX-Verfahrens ist eine kombinatorische Bibliothek bestehend aus einzelsträngigen Nukleinsäuren

## 1. Einleitung

mit einer Diversität bis zu  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen [78]. Diese umfasst einen randomisierten Bereich von üblicherweise 30-80 Nukleotiden, der jeweils von zwei konstanten Primerregionen flankiert ist. Der entscheidende Schritt eines SELEX-Experiments ist die Selektion, bei der die bindenden von den ungebundenen Nukleinsäuren abgetrennt werden. Hierfür sind eine Vielzahl an Möglichkeiten beschrieben worden [79]. Eine häufig verwendete Methode ist die von Pristoupil *et. al* entwickelte Filtration der Aptamer-Protein-Komplexe über eine Nitrozellulosemembran [74, 80-83]. Eine ebenfalls breite Anwendung zur Separation funktionaler Nukleinsäuren findet die Affinitätschromatographie, wobei das Zielmolekül immobilisiert wird [27, 37, 39, 76, 84, 85] die Kapillarelektrophorese [38, 86, 87], die native Gelelektrophorese [88], das *UV-cross-linking* [89], die Zentrifugation [90], die Immobilisierung des Targetmoleküls auf einer ELISA-Platte [91] oder aber auch die in Abbildung 1.10 beschriebene Technik der magnetischen Separation [35, 92]. Die Anwendung solcher magnetischen Partikel ist eine schnelle, einfache und effektive Methode, die nur geringe Mengen des entsprechenden Zielmoleküls erfordert [93]. Zudem ist eine automatisierte Durchführung von SELEX-Prozessen mittels dieser Technologie gegeben [48, 94, 95]. Da magnetische Partikel (Beads) mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen angeboten werden (z. B. Streptavidin-, Epoxy-, Tosyl- oder Antikörperbeschichtung; Invitrogen [96]), lassen sich unterschiedlichste Targetmoleküle immobilisieren [35, 63, 97]. Seit der ursprünglich eingeführten SELEX-Methode sind in den letzten Jahren unzählige SELEX-Varianten mit für die jeweilige Selektion angepassten Bedingungen entwickelt worden. Hier seien die Photo- [98], *genomic*- [99, 100], *complex target*- [101, 102] und *cell*-SELEX [103-105] sowie die FACS-SELEX [43, 106] zu erwähnen.

Nach Abtrennung der mit dem Zielmolekül interagierenden Nukleinsäuren werden diese amplifiziert und in die nächste Selektionsrunde eingesetzt. Da die Komplexität der Bibliothek eine Anreicherung bindender Nukleinsäuren in einem einzigen Selektionszyklus nicht zulässt, werden mehrere Zyklen iterativ durchlaufen bis die funktionellen Nukleinsäuren im Pool dominieren [107]. Durch Klonierung und Sequenzierung werden die im Pool angereicherten Nukleinsäure-Moleküle vereinzelt und charakterisiert. Zur Determinierung der Aptamerbindung können fluorometrische oder radioaktive Bindungsstudien, die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) oder die Durchflusszytometrie herangezogen werden [108].

## 1. Einleitung

### 1.4. Zielsetzung

Zytokine sind wichtige humorale Mediatoren, die eine Vielzahl biologischer Prozesse regulieren. Sie entfalten ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Bei der Entzündungsreaktion spielt das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) eine essentielle Rolle und stimuliert verschiedene Zelltypen über seinen membrangebundenen (IL-6R) oder löslichen Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R). Eine Dysregulation der sIL-6R- bzw. IL-6-Produktion geht mit einer Vielzahl an Erkrankungen, wie z. B. der rheumatoiden Arthritis (RA), einer inflammatorischen Autoimmunerkrankung einher. Eine zu der Antikörper-Therapie alternative Strategie zur Blockade der IL-6/IL-6R-vermittelten Signaltransduktion, könnte die Anwendung von Aptameren bieten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Selektion IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere und deren Charakterisierung. Durch Anwendung des *in vitro* Selektionsprozesses SELEX sollten DNA-Aptamere angereichert und anschließend anhand verschiedener Methoden, wie radioaktiven Bindungsstudien, FCS-Messungen, Oberflächenplasmonresonanz (SPR) und Durchflusszytometrie detailliert charakterisiert werden.

Durch Bindungsstudien an relevanten Kontrollproteinen sollte die Spezifität der selektierten Aptamere untersucht werden.

Mit Hilfe der Sekundärstrukturvorhersage sollten die DNA-Aptamere bis auf ein minimales Bindemotiv verkürzt werden. Durch Mutationsanalysen sollten an der Aptamerbindung beteiligte Basen identifiziert werden.

Durch *in vitro* Kompetitionsstudien mit den natürlichen IL-6R-Liganden (IL-6 und gp130) sollte die Bindung der Aptamere an den Rezeptor studiert werden.

Die Methode der Durchflusszytometrie sollte dazu dienen, das Bindungsverhalten der Aptamere an den IL-6R auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen zu analysieren.

## 2. Material

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Vakulab S 3000
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Elektrophoreseapparaturen	Biorad, München, D
Elektroporator	Biorad, München, D
Elektroporationsküvetten	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Exposure-Kassette	Biorad, München, D
Geiger-Müller-Zähler	Berthold, LB 122, LB1200
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen, D
Geltrocknungsanlage	Biorad, München
Minifold I Dot-Blot System	Schleicher&Schuell
pH Meter inoLab	WTW, Weilheim, D
Photometer	
NanoDrop ND-100	PeqLab, Erlangen, D
PhosphorImager	Biorad, München, D
Reinstwasseranlage USF ELGA PureLab Plus	Elga Labwater, Celle, D
Schüttelinkubatoren	
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen, D
Thermocycler	
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbad	HLG, Düsseldorf, D
Zentrifugen	
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

## 2. Material

### 2.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Standardchemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und AppliChem (Darmstadt) in Analyse-Qualität bezogen. Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage angesetzt.

### 2.3. Nukleotide und Radionukleotide

Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roth
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic

### 2.4. Enzyme

ExtrAvidin <sup>®</sup> -Alkaline Phosphatase	Sigma
FIREPol <sup>®</sup> DNA Polymerase	Solis BioDyne
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK)	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas
EcoRI	Fermentas
HindIII	Fermentas

### 2.5. Protein- und DNA-Standards

PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler <sup>™</sup> Unstained Protein Ladder	Fermentas
O'GeneRuler <sup>™</sup> Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler <sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder	Fermentas

### 2.6. Kommerziell erhältliche Kits

NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II	Machery&Nagel (Düren)
HiYield <sup>®</sup> Plasmid Mini Kit	Süd-Laborbedarf (Gauting)

## 2. Material

### 2.7. Puffer, Lösungen und Medien

Tab. 2.1: Kommerzielle Puffer von Fermentas.

Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS)	10% (w/v) APS in aqua dest.
DNA-Ladepuffer (6x)	50% (w/v) Saccharose; 1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Orange G
DNA-Sequenzierungspuffer (5x)	<i>BigDye Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer</i> AppliedBiosystems
PCR-Puffer B (10x)	800 mM Tris-HCl; pH 8,8; 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,2% (w/v) Tween-20
PNK-Puffer A (10x)	500 mM Tris-HCl; pH 7,6; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA
Tango-Puffer (10x)	330 nM Tris-Acetat (pH 7,5); 100 mM Mg (CH <sub>3</sub> OO) <sub>2</sub> ; 660 mM K (CH <sub>3</sub> OO); 1 mg BSA/mL
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM DTT; 5 mM ATP; (pH 7,8, bei 25 °C)

Tab. 2.2: Allgemeine Puffer zur Nukleinsäuren-Analyse und Aptamerselektion.

Puffer	Zusammensetzung
B&W-Puffer (2x)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 M NaCl
Kopplungspuffer A	1x PBS; 1 µg/µL BSA; pH 7,4
Kopplungspuffer B	1,25x PBS; 1 µg/µL BSA; pH 7,4
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Selektionspuffer A	1x PBS; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
Selektionspuffer B	1x PBS; pH 7,4
Selektionspuffer C	1x PBS; 30 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
Tris-HCl	1 M Tris-HCl; pH 7,4
Tris-Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
Tris-Puffer B	20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 3 mM MgCl <sub>2</sub>



## 2. Material

---

Tris-Puffer C	20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM KCl
Tris-Puffer D	20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl
TBE (5x)	445 mM Tris-HCl; 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA
TEN-Puffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA

---

**Tab. 2.3: Allgemeine Puffer und Lösungen zur Proteinanalyse.**

---

Puffer	Zusammensetzung
BCIP-Lösung (10x)	0,5% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) in DMF
<i>Coomassie</i> -Entfärbelösung	10% (v/v) Eisessig
<i>Coomassie</i> -Färbelösung	0,25% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> ; 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 (10x)	0,1% (w/v) NBT
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
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% SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,002% (w/v) Bromphenolblau;
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,4% SDS

---

## 2. Material

**Tab. 2.4: Medien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten.**

Medien	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung	50 mg Ampicilin pro mL aqua dest.
LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton pro 1 Liter aqua dest.
Pen/Strep (100x)	6,25 mg Penicillin G Natriumsalz/mL; 10 mg Streptomycin/mL; 9 mg NaCl/mL in aqua 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> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose; 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt

### 2.8. Materialien für die Aptamerselektion

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

### 2.9. Synthetische Oligonukleotide

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

**Tab. 2.5: Verwendete Oligonukleotide.**

Oligonukleotid	Sequenz in 5'–3'–Richtung
DNA Pool D1 (101 nt)	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC–N60–CATGCTTATTCTTGTCTCCC
Primer-D-Fw	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
Primer-D-Rev-bio	GGGAGACAAGAATAAGCATG mit 5'-Biotin-Modifikation
EcoRI-Primer-D-Fw	AGCTGAATTCGCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
HindIII-Primer-D-Rev	AGCTAAGCTTGGGAGACAAGAATAAGCATG
13-15_A	CTTCAACGTACTCCCGGGGTTTGGGTGGGTGGGTATCGGGAGTAGG CCGCAACTGCCTG
13-15_B	ACTCCCGGGGTTTGGGTGGGTGGGTATCGGGAGT

## 2. Material

---

13-15_C	GTTGTGAGCCTCCTAACCTTCAACGTACTCCCGGGGGTTTGGGTGGGT GGGTATCGGGAGTAGGCCGCAAC
13-15_D	GGGGGTTTGGGTGGGTGGG
13-15_D1	GGGTTTGGGTGGGTGGGT
13-15_D1-G2T	GTGTTTGGGTGGGTGGGT
13-15_D1-G8T	GGGTTTGTGTGGGTGGGT
13-15_D1-G12T	GGGTTTGGGTGTGTGGGT
13-15_D1-G16T	GGGTTTGGGTGGGTGTGT
13-15_D1-488	GGGTTTGGGTGGGTGGGT mit 3'-AlexaFluor <sup>®</sup> 488
13-27_A	GAAGGACACGGTTTAGGGGTGGGTGGGTGGGTAGCTACCGGTGCCTT GGTTGGGGGTGGG
13-27_B	CCTAACGAAGGACACGGTTTAGGGGTGGGTGGGTGGGTAGCTACCGGT GCCTTGGTTGGG
13-27_C	ACGGTTTAGGGGTGGGTGGGTGGGTAGCTACCGG
13-27_D	GGGTGGGTGGGTGGGT
13-27_D-G6T	GGGTGTGTGGGTGGGT
13-27_D+T1	TGGGTGGGTGGGTGGG
13-27_D+T1T17	TGGGTGGGTGGGTGGGT
13-27_D-T	GGGTGGGTGGGTGGG
13-27_D-T4A	GGGAGGGTGGGTGGGT
13-27_D-T8A	GGGTGGGAGGGTGGGT
13-27_D-T12A	GGGTGGGTGGGAGGGT
13-27_D-T16A	GGGTGGGTGGGTGGGA
13-27_D+A	GGGAGGGAGGGAGGGA
13-27_D-T-488	GGGTGGGTGGGTGGG mit 3'-AlexaFluor <sup>®</sup> 488
13-27_D-T_G6T-488	GGGTGTGTGGGTGGG mit 3'-AlexaFluor <sup>®</sup> 488
13-27_D-T_G2T	GTGTGGGTGGGTGGG
13-27_D-T_G6T	GGGTGTGTGGGTGGG

---

## 2. Material

---

13-27_D-T_G10T	GGGTGGGTGTGTGGG
13-27_D-T_G14T	GGGTGGGTGGGTGTG
16-3_A DNA	GGGGAGGCTGTGGTGAGGG
G <sub>2</sub> T	GGTGGTGGTGGT
G <sub>4</sub> T	GGGGTGGGGTGGGGTGGGGT
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG

---

### 2.10. Proteine

Die verwendeten Zytokine und Rezeptoren wurden von unseren Kooperationspartnern in Kiel (Professor Stefan Rose-John, Professor Jürgen Scheller, Professor Joachim Grötzinger und Dr. Inken Lorenzen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### - Hyper-IL-6

Das Hyper-IL-6 (~ 57 kDa) ist ein bioaktives Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R die über einen flexiblen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind.

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

Das humane rekombinante IL-6 (~ 21 kDa) wurde in *E. coli* exprimiert.

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

Der humane sIL-6R (~ 50 kDa) wurde in CHO-Zellen produziert und trägt C-terminal einen His-Tag.

#### - Lösliches gp130-Fc (sgp130Fc)

Das lösliche gp130-Fc (Dimer ~ 189 kDa) wurde durch genetische Fusion des löslichen gp130 mit dem konstanten Teil eines IgG1-Antikörpers (Fc) synthetisiert. Durch die Fc-Komponente wird eine Dimerisierung vermittelt. Sgp130-Fc wurde in COS7-Zellen produziert.

## 2. Material

### CEACAM1 (Karzinoembryonales Antigen Zelladhäsionsmolekül)

Das rekombinante, lösliche CEACAM1 (etwa 70 kDa) wurde in Insektenzellen (Sf9) produziert. Es besteht aus vier extrazellulären Immunglobulin-Domänen und trägt C-terminal einen Hexa-Histidin-Tag. CEACAM1 wurde von Frau Dr. Andrea Horst (Universitätsklinikum Eppendorf-Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### Lysozym

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

### Thrombin

Das humane  $\alpha$ -Thrombin (~ 37 kDa) wurde von der Firma CellSystems käuflich erworben.

## **2.11. Verwendetes Plasmid und Bakterienstamm**

Zur Klonierung der angereicherten DNA-Bibliothek wurde das Plasmid pUC19 verwendet.

### *E. coli* TOP10

(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*)

## **2.12. Zelllinien**

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung des Bindungsverhaltens der selektierten Aptamere *in vivo* wurde die murine Prä-B-Zelllinie BAF/3 verwendet, deren Wachstum durch die Anwesenheit von IL-3 stimuliert wird.

Durch stabile Transfektion dieser Zellen mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. den cDNAs für gp130, IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL6R/TNF) wurden zwei Zelllinien geschaffen, die für die Analyse der Bindung IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere *in vivo* geeignet waren. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Professor Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

## 3. Methoden

### 3.1. Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren

#### 3.1.1. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse und Trennung von Nukleinsäuren erfolgte mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Die Zusammensetzung der hierfür verwendeten Polyacrylamidgele (PAA-Gele) ist in Tab. 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1: Zusammensetzung nativer Polyacrylamidgele.**

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

Durch Zugabe von APS wurde die Polymerisation initiiert. Nach vollständiger Polymerisation des Gels (nach etwa 30-45 min), wurden die zu analysierenden DNA-Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei 200 V in 1x TBE-Puffer. Nach Beendigung der PAGE wurden die DNA-Banden mittels Ethidiumbromid visualisiert (3.1.3).

#### 3.1.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Reinigung und Analyse von einzelsträngiger DNA (ssDNA) erfolgte je nach Länge der Fragmente über 10%ige (>30 nt) bzw. 15%ige (<20 nt) denaturierende PAA-Gele (Tab. 3.1), denen im Vergleich zu nativen Gelen 8 M Harnstoff als denaturierendes Agens zugesetzt wurde. Vor Beladung der Gele erfolgte ein 15-30 minütiger Vorlauf bei 8-10 W. Nach Spülen der Taschen wurde das Gel mit den vorbereiteten Proben beladen und die Elektrophorese in 1x TBE durchgeführt.

Zur Analyse wurden jeweils 1 µL der DNA mit 8 µL 8 M Harnstoff und 1 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und für 3 min bei 80 °C denaturiert.

Zur Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten aus PAA-Gelen (3.1.6) wurden die PNK-Ansätze (3.2.4) mit gleichem Volumen einer 8 M Harnstoff-Lösung und 1 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und für 3 min bei 80 °C denaturiert.

### 3. Methoden

Nach beendeter Elektrophorese erfolgte die Detektion der Nukleinsäuren entweder mittels UV-Shadowing (3.1.4) oder Autoradiographie (3.1.5).

#### **3.1.3. Nachweis von Nukleinsäuren mittels Ethidiumbromid**

Ethidiumbromid (EtBr) ist ein heterozyklischer, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Zur Visualisierung von Nukleinsäuren in PAA-Gele wurden diese nach der Elektrophorese für 2 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (4 µg EtBr pro 1 mL 1x TBE) gefärbt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm konnten die Nukleinsäuren als leuchtende Banden im Gel visualisiert werden.

#### **3.1.4. Nachweis von Nukleinsäuren mittels *UV-Shadowing***

Zur präparativen Reinigung von Nukleinsäuren aus PAA-Gelen, wurde die Methode des *UV-Shadowing* verwendet. Der Nachweis der Nukleinsäuren beruht auf der Absorption der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das PAA-Gel wurde hierfür in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war. UV-Licht (254 nm) lässt den Fluoreszenzfarbstoff leuchten. An den Stellen an denen sich die Nukleinsäuren befanden, kam es zur Fluoreszenzlöschung, so dass diese als dunkle Schatten sichtbar wurden. Nukleinsäure-Banden konnten markiert, ausgeschnitten und einer Extraktion (3.1.6) unterzogen werden.

#### **3.1.5. Nachweis von Nukleinsäuren mittels Autoradiographie**

Zur Visualisierung von mit <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten Nukleinsäuren in PAA-Gelen wurde das Gel in Klarsichtfolie eingeschlagen, auf eine PhosphorImager-Plate überführt und in einer dazugehörigen Kassette exponiert. Die Exponierzeiten variierten dabei zwischen 3 und 16 Stunden. Die Identifizierung der Nukleinsäuren erfolgte schließlich am PhosphorImager (BioRad) unter Verwendung der Software Quantity One<sup>®</sup>.

#### **3.1.6. Extraktion von DNA aus Polyacrylamidgelen**

Die in PAA-Gelen elektrophoretisch getrennte DNA konnte über Diffusionselution aus dem Gel extrahiert werden. Hierfür wurden die ausgeschnittenen Gelstücke mit 200 µL TEN-Puffer (Tab. 2.2) bedeckt und unter Schütteln (1400 rpm) für 45 min bei 42 °C inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen, in ein neues Tube überführt und die Gelstücke ein zweites Mal mit frischem TEN-Puffer bedeckt. Nach weiteren 45 min Elution wurde der Puffer

### 3. Methoden

abgenommen und mit dem vorherigen Eluat vereinigt. Der Elutionsansatz (400  $\mu\text{L}$ ) wurde einer Ethanolfällung (3.1.7) unterzogen.

#### 3.1.7. Natriumacetat-Ethanolpräzipitation

In Gegenwart von Natriumacetat und Ethanol können Nukleinsäuren gefällt und somit konzentriert werden. Hierfür wurden die zu fällenden Nukleinsäure-Ansätze mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und dem 2,5 fachen Volumen an kaltem, abs. Ethanol versetzt. Zusätzlich wurde 1  $\mu\text{L}$  Glycogen als Carrier zur besseren Präzipitation zugesetzt. Die Präzipitation erfolgte meist ÜN oder für 1 Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Fällungsansatz wurde für 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Präzipitat 2x mit je 200  $\mu\text{L}$  70%igem Ethanol gewaschen und unter oben beschriebenen Bedingungen jeweils für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und die DNA in einem geeigneten Volumen aqua dest. resuspendiert.

#### 3.1.8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Konzentrationen einer Nukleinsäurelösung erfolgte am NanoDrop ND-1000 durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ). Dabei entsprachen:

$$\begin{aligned}\text{OD}_{260} = 1 & \rightarrow 50 \text{ ng doppelsträngige DNA (dsDNA)/}\mu\text{L} \\ \text{OD}_{260} = 1 & \rightarrow 30 \text{ ng einzelsträngige DNA (ssDNA)/}\mu\text{L}.\end{aligned}$$

Der Quotient aus  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren und sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Für die Berechnung der Molarität wurde eine durchschnittliche Masse von 327 g/mol pro Nukleotid angenommen.

#### 3.1.9. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels des *PCR Purification Kits „NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II“* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde in 40  $\mu\text{L}$  aqua dest. eluiert.

### 3.2. Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA erfolgte in 100  $\mu\text{L}$  Ansätzen und wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die PCR-Reaktion führt zu einer exponentiellen Vermehrung eines DNA-Templates.



### 3. Methoden

Die während der Selektion (3.4) eluierte angereicherte ssDNA (50  $\mu\text{L}$ , 3.4) wurde á 25  $\mu\text{L}$  als Template auf zwei PCR-Ansätze verteilt. Für die Amplifikation dieser ssDNA wurde das Primerpaar Primer-D-Fw und der biotinylierte Primer-D-Rev-bio (Tab. 2.5) verwendet.

Ein Ansatz wurde als Template für weitere Untersuchungen der jeweiligen Selektionsrunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der zweite wurde einer Strangtrennung (3.2.3) unterzogen und als ssDNA in die nächste Selektionsrunde eingesetzt.

Bei der Amplifikation von dsDNA aus einer PCR wurde lediglich 1  $\mu\text{L}$  DNA als Template in den PCR-Ansatz eingesetzt. Zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen (für die Klonierung 3.5) wurden die Primer EcoRI-Primer-D-Fw und HindIII-Primer-D-Rev (Tab. 2.5) verwendet. In Tabelle 3.2 ist ein typischer PCR-Ansatz dargestellt.

**Tab. 3.2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.**

Komponente	$\mu\text{L}/\text{Ansatz}$	Endkonzentration
ss/dsDNA-Template	1 bzw. 25	
PCR-Puffer B (10x)	10	1x
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	6,0	1,5 mM
dNTP-Mix (25 mM)	0,8	200 $\mu\text{M}$
Primer-Fw (100 $\mu\text{M}$ )	1,0	1,0 $\mu\text{M}$
Primer-Rev (100 $\mu\text{M}$ )	1,0	1,0 $\mu\text{M}$
FIREPol <sup>®</sup> (5 U/ $\mu\text{l}$ )	1,0	0,05 U/ $\mu\text{L}$
Aqua dest.	Ad. 100	

Der zyklische Prozess der PCR setzt sich aus drei Teilschritten zusammen: die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , die Primeranlagerung an die DNA-Einzelstränge (Temperatur hängt von der Basenzusammensetzung der Primer ab) und die Synthese des komplementären Stranges durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase bei  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In Tabelle 3.3 ist das verwendete Temperaturprogramm zusammengefasst. In Abhängigkeit der eingesetzten Menge an DNA-Template konnte die Zyklenzahl variiert werden.

### 3. Methoden

**Tab. 3.3: PCR-Temperaturprogramm.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	} 5 – 25
Primeranlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	4 °C	∞	1

Ein Ansatz ohne DNA-Template diente jeweils als Negativkontrolle. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot von 5 µL entnommen, mittels nativer PAGE (3.1.1) und anschließender Ethidiumbromid-Färbung (3.1.3) analysiert.

#### 3.2.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle und effiziente Methode, um bakterielle Klone, die nach Transformation das gewünschte rekombinante Plasmid aufgenommen haben, zu identifizieren. Hierfür wurde eine Bakterienkolonie, von der entsprechenden Agarplatte abgenommen und direkt in den PCR-Ansatz (3.2.1) überführt. Für die Kolonie-PCR wurden die Primer EcoRI-Primer-D-Fw und HindIII-Primer-D-Rev (Tab. 2.5) verwendet.

#### 3.2.3. DNA-Strangtrennung mittels Dynabeads® M-280

Für den zyklischen *in vitro* Selektionsprozess war es notwendig einzelsträngige DNA in die nächste Selektionsrunde einzusetzen. Die angereicherte und eluierte DNA aus dem repetitiven Zyklus wurde mittels PCR durch die Verwendung eines biotinylierten reversen Primers (Primer-D-Rev-bio, Tab. 1.4) markiert. Die daraus resultierende biotinylierte dsDNA wurde unter Verwendung von mit Streptavidin beschichteten magnetischen Partikeln (Dynabeads®; Pierce) wieder in Einzelstrang-DNA getrennt.

Zunächst wurden 100 µL Dynabeads® nach dreimaligem Waschen mit je 100 µL 1x B&W Puffer (Tab. 2.2) in 100 µL 1x B&W aufgenommen. Die Beads-enthaltenden Tubes wurden jeweils für 1 min im Magnetständer gestellt, so dass der Überstand einfach abpipettiert werden konnte. 100 µL PCR-Produkt (3.2.1) wurden mit gleichem Volumen an 2x B&W versetzt und zu den vorbereiteten Beads gegeben. Die Ansätze wurden für 15 min bei RT inkubiert, wobei alle 3-5 min die Ansätze durch auf- und abpipettieren vermischt wurden, um eine Sedimentation der Beads zu verhindern. Überschüssige bzw. nicht gebundene DNA

### 3. Methoden

wurde durch dreimaliges Waschen mit je 100  $\mu\text{L}$  1x B&W Puffer entfernt. Die Elution des nicht-biotinylierten Aptamerstrangs erfolgte durch alkalische Denaturierung. Dazu wurden die Beads nach dem Waschvorgang in 20  $\mu\text{L}$  150 mM NaOH Lösung resuspendiert und für 3 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Tube überführt und der Vorgang wiederholt. Durch Zugabe von etwa 40  $\mu\text{L}$  150 mM KCl wurde der alkalische Überstand neutralisiert und gegebenenfalls auf einen pH-Wert von etwa 7,5 eingestellt.

#### 3.2.4. Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA

Durch die T4 Polynukleotidkinase (T4-PNK) wird der Transfer einer radioaktiv markierten  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-Phosphatgruppe des ATP an die 5'-Hydroxylgruppe von synthetischen Oligonukleotiden katalysiert. Ein 20  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz wurde wie in Tab. 3.4 zusammengestellt pipettiert.

**Tab. 3.4: Ansatz zur Kinasierung von DNA am 5'-Ende mittels T4-PNK.**

Komponente	$\mu\text{L}/\text{Ansatz}$	Endkonzentration
ssDNA-Oligonukleotid	10 pmol	
10x PNK-Puffer A	2,0	1x
$\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ )	1,0 - 3,0	1,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$
T4-PNK (10 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0	0,5 U/ $\mu\text{L}$
Aqua dest.	Ad. 20	

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min. Um die Reaktion zu inaktivieren, wurden die Ansätze für 10 min bei 80 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend aus denaturierenden PAA-Gelen (3.1.2) mittels Diffusionselution (3.1.6) von nicht inkorporiertem  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP gereinigt.

### 3.3. Allgemeine Methoden zur Proteinanalyse

#### 3.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Separation von Proteinen wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE nach dem Prinzip von Laemmli [109] eingesetzt. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem stark negativ geladenen Detergenz, erhalten alle Proteine eine negative Ladung. Dies ermöglicht eine Trennung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht. Zusätzlich wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel mit 2x SDS-Proteinladepuffer (Tab. 2.3) versetzt und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die SDS-

### 3. Methoden

Gele setzten sich aus einem fokussierenden Sammelgel und einem separierenden Trenngel (Tab. 3.5 und 3.6) zusammen.

**Tab. 3.5: Zusammensetzung des Sammelgels.**

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%

**Tab. 3.6: Zusammensetzung der Trenngele.**

Komponente	7,5%ige PAA-Gele	15%ige PAA-Gele
Trenngelpuffer (4x)	1x	1x
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	7,5%	15%
TEMED (v/v)	0,07%	0,07%
APS (w/v)	0,07%	0,07%

#### **3.3.2. Anfärben von Proteinen in SDS-PAA-Gelen mit *Coomassie Brilliant Blue***

Um die Proteinbanden nach erfolgter SDS-PAGE (3.3.1) sichtbar zu machen, wurde das Gel für 1 h in *Coomassie*-Färbelösung (Tab. 2.3) geschwenkt und abschließend in 10%iger Essigsäure entfärbt.

#### **3.3.3. Biotinylierung von Proteinen**

Der Einsatz von magnetischen Partikeln für die *in vitro* Selektion sIL-6R-spezifischer DNA-Aptamere erforderte die Biotinylierung des Zielmoleküls und dessen Immobilisierung an mit Streptavidin beschichteten Dynabeads<sup>®</sup> (Pierce). Zur spezifischen Markierung von primären Aminen wurde das Sulfo-NHS-LC-Biotin-Reagenz (Pierce) in einem dreifach molaren Überschuss gegenüber dem zu biotinylierenden Protein (sIL-6R) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis und weiteren 15min bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde mittels Dialyse entfernt (3.3.4).

### 3. Methoden

#### 3.3.4. Dialyse

Die Dialyse des biotinylierten sIL-6R erfolgte, zur Abtrennung ungebundenen Biotins, in einer *Slide-A-Lyzer*<sup>®</sup> Dialysekassette (MWCO = 10.000; 2.8) über Nacht gegen 1x Selektionspuffer B (Tab. 2.2).

#### 3.3.5. Dot Blot

Zur Detektion Biotin-markierter Proteine (hier: sIL-6R) wurden definierte Mengen des Proteins auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Probe an nicht modifiziertem Protein. Nach Trocknen wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen in 25 mL Blockpuffer (Tab. 2.3) überführt und für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 25 mL 1x PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei RT in 25 mL AK-Puffer mit 10 µL ExtrAvidin Alkaliner<sup>®</sup> Phosphatase (Sigma) wurde die Membran zweimal mit 25 mL 1x PBS und einmal in 25 mL Reaktionspuffer jeweils für 5 min gewaschen. Durch Zugabe von 12,5 mL AP-Substratlösung (NBT-BCIP) wurde die Farbreaktion eingeleitet. Durch Überführung der Membran in Wasser wurde die Reaktion beendet.

#### 3.3.6. Kopplung biotinylierter Proteine an magnetische Partikel (Dynabeads<sup>®</sup> M-280)

Der biotinylierte sIL-6R (3.3.3) wurde auf der Oberfläche von paramagnetischen Polystyrenkügelchen (Dynabeads<sup>®</sup>), die auf deren hydrophoben Oberfläche Streptavidin kovalent präsentieren, immobilisiert. Dabei macht man sich die starke Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin zu Nutze.

Für die Kopplungsreaktion wurden 150 µL Dynabeads<sup>®</sup> fünfmal mit je 150 µL Kopplungspuffer A (Tab. 2.2) gewaschen und in 300 µL desselben Puffers resuspendiert. 30 µg des biotinylierten sIL-6R wurden zugegeben und für 15 min bei 4 °C invertiert. Anschließend wurde der Ansatz fünfmal mit je 150 µL Kopplungspuffer A und zweimal mit je 150 µL Kopplungspuffer B (Tab. 2.2) gewaschen. Die sIL-6R-Beads wurden in 450 µL Kopplungspuffer B resuspendiert und konnten direkt für die Aptamerselenktion verwendet werden. Der Ansatz wurde bei 4 °C gelagert.

### 3.4. Durchführung der *in vitro* Selektion (SELEX) mittels Dynabeads<sup>®</sup>

Für die Anreicherung sIL-6R-spezifischer ssDNA-Aptamere wurde zu Beginn der ersten Selektionsrunde eine definierte Menge (500 pmol) der ssDNA-Bibliothek D1 (Tab. 2.5) mit dem an Dynabeads<sup>®</sup> immobilisierten (3.3.6) sIL-6R (108 pmol) in 1x Selektionspuffer A (Tab. 2.2) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch magnetische Separation konnten die an das

### 3. Methoden

Target bindenden DNA-Moleküle von den nicht bindenden Molekülen abgetrennt werden, der Überstand wurde verworfen und die DNA-sIL-6R-Komplexe einmal mit 100 µL Selektionspuffer A gewaschen. Die Elution bindender Nukleinsäuren erfolgte nach Resuspension in 55 µL aqua dest. durch Inkubation bei 80 °C für 3 min im Wasserbad. Das Eluat wurde auf zwei PCR-Ansätze verteilt und amplifiziert (3.2.1). Zur Kontrolle der PCR wurde eine native PAGE (3.1.1) durchgeführt. Ein PCR-Ansatz wurde für weitere Untersuchungen der jeweiligen Selektionsrunde bei -20 °C gelagert. Der Zweite wurde im Anschluss einer Strangtrennung (3.2.3) unterzogen, so dass ssDNA für die nächste Selektionsrunde zur Verfügung stand. Um die Stringenz zu erhöhen, wurde einerseits mit jeder Selektionsrunde die Anzahl der Waschschrte erhöht und andererseits ab der dritten Runde die eingesetzten Mengen sowohl an DNA als auch an sIL-6R reduziert. Eine Übersicht über die Selektionsrunden 1-13 liefert die Tabelle 4.1 des Ergebnisteils.

#### 3.5. Klonierung der angereicherten DNA-Bibliothek

Um die unterschiedlichen Sequenzen der angereicherten Bibliothek analysieren zu können, wurde die DNA-Bibliothek aus der Selektionsrunde 13 durch Klonierung in *E. coli* Zellen separiert. Für die Klonierung wurde das Plasmid pUC19 verwendet.

##### 3.5.1. Restriktion der DNA und des Vektors

Für die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pUC19 mussten beide Komponenten durch Doppelrestriktion geschnitten werden.

An die dsDNA aus der Selektionsrunde 13 wurden mittels PCR die notwendigen Restriktionsschnittstellen angehängt (3.2.1). Nach Kontrolle der PCR mittels nativer PAGE (3.1.1) wurden die PCR-Produkte mit dem *NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II*-Kit (3.1.9) gereinigt. Die Hälfte des gereinigten PCR-Produktes und 5 µg des Vektors wurden separat jeweils mit den Enzymen EcoRI und HindIII restringiert (Tab. 3.7). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

**Tab. 3.7: Restriktionsansatz für PCR-Produkte und Plasmid-DNA.**

Komponente	µL/Ansatz	Endkonzentration
DNA	½ PCR-Produkt bzw. 5 µg pUC19	
10x Tango Puffer	20	2x
EcoRI (10 U/µL)	2	0,2 U/µL
HindIII (10 U/µL)	4	0,4 U/µL
Aqua dest.	Ad. 100	

### 3. Methoden

Der Erfolg der Restriktion wurde mittels PAGE untersucht (3.1.1). Das geschnittene PCR-Produkt wurde erneut mit Hilfe des *NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II*-Kit (3.1.9) gereinigt und der Vektor desphosphoryliert (3.5.2).

#### 3.5.2. Dephosphorylierung des Vektors

Um eine intramolekulare Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser durch Zugabe von SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) dephosphoryliert. Zu 40 µL des Restriktionsansatzes des Vektors (3.5.1) wurden im Anschluss 2 µL SAP zugesetzt. Da das Enzym im Tango-Puffer ebenfalls zu 100% aktiv ist, war es nicht notwendig SAP-Puffer zuzusetzen. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C für 1 h und wurde durch Erhitzung auf 65 °C für 15 min inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor wurde mittels *NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II*-Kit (3.1.9) gereinigt.

#### 3.5.3. Ligation

Nach der Restriktion wurden der linearisierte, dephosphorylierte Vektor und die geschnittene DNA ligiert. Die T4-DNA-Ligase ist für die Katalyse von Phosphodiesterbindungen zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA verantwortlich. Für die gerichtete Ligation in einem 10 µL Ligationsansatz, wurde ein molares Verhältnis Vektor:Insert von 1:3 bzw. 1:5 gewählt. Hierzu wurden jeweils 1 µL der T4-DNA-Ligase und des T4-DNA-Ligase-Puffers pipettiert. Ligiert wurde über Nacht bei 22 °C. Ein Ansatz ohne Insert diente als Negativkontrolle.

#### 3.5.4. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* TOP10-Zellen wurde eine Vorkultur dieser Zellen in LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur für das Animpfen einer 400 mL Hauptkultur verwendet, die unter gleichen Bedingungen bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert wurde. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die Kultur wurde auf 50 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 4 °C und 3.000 g für 15 min zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit 50 mL und zweimal mit 25 mL eiskaltem aqua dest. gewaschen, vereinigt und erneut wie oben beschrieben für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL 10%igem Glycerol resuspendiert und Aliquots á 100 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

### 3. Methoden

#### 3.5.5. Transformation mittels Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen (3.5.4) wurden für die Transformation mittels Elektroporation auf Eis aufgetaut. Zu 50 µL kompetenten Zellen wurden jeweils 2 µL der Ligationsansätze (3.5.3) pipettiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation bei 1,8 kV. Durch Zugabe von 450 µL auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium (Tab. 2.4) wurden die Zellen aus der Küvette in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. 50 µL, 100 µL und 250 µL Zellsuspension wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Zellen ausplattiert, die nur mit dem Vektor bzw. nur mit aqua dest. transformiert wurden.

#### 3.5.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* TOP10-Zellen erfolgte mit Hilfe des *Hi Yield Plasmid Mini-DNA-Kits* (Süd-Laborbedarf) nach Herstellerangaben.

#### 3.5.7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels der *BigDye Terminator Cycle* Methode unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten 2′-,3′-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten. Tab. 3.8 zeigt die Zusammensetzung des Sequenzieransatzes.

**Tab. 3.8: Ansatz zur Sequenzierung.**

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

2 µL des *BigDye Terminator Mix* wurden nach einer ersten Denaturierung der Proben für 5 min bei 96 °C zugegeben und die Sequenzierungsreaktion wie in Tab. 3.9 gezeigt durchgeführt.



### 3. Methoden

**Tab. 3.9: Temperaturprofil einer Sequenzierungsreaktion**

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

## 3.6. Untersuchung der Aptamer-Protein-Interaktionen

### 3.6.1. Analytische Filterbindungsstudien

Filterbindungsstudien unter radioaktiven Bedingungen wurden für die Untersuchung von Aptamer-Protein-Interaktionen und zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten herangezogen. Dazu wurde die jeweilige radioaktiv markierte DNA (3.2.4) in konstanten Mengen (< 0,5 nM) mit steigenden Konzentrationen (0 bis 1 µM) an Protein für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Filterbindungsstudien wurden, soweit nicht anders erwähnt, im Selektionspuffer A durchgeführt. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Salze auf die Aptamerbindung wurden jeweils im entsprechenden Puffer durchgeführt (Tab. 2.2). Eine Nitrozellulosemembran wurde vor der Filtration zur Minimierung unspezifischer DNA-Bindung mit einer 0,4 M KOH-Lösung für 15 min behandelt und abschließend mit aqua dest. gewaschen. Die so behandelte Membran wurde in eine 96-well Minifold I Dot Blot Apparatur (Schleicher&Schüll) eingespannt und unter Vakuum zweimal mit je 200 µL Selektionspuffer A gewaschen. Die Reaktionsansätze wurden anschließend über die Nitrozellulosemembran filtriert. DNA-Moleküle die an das Protein banden wurden auf der Membran zurück gehalten. Durch viermaliges Waschen mit je 200 µL Selektionspuffer A wurden nicht-bindende DNA-Moleküle entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde luftgetrocknet und die auf der Membran verbliebene Menge an radioaktiv markierter DNA mittels Autoradiographie (3.1.5) quantifiziert. Unter Verwendung der Software Quantity One<sup>®</sup> wurden die erhaltenen Daten ausgewertet und das Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> zur graphischen Darstellung von Bindungskurven genutzt. Durch die Annahme, jedes Aptamer hätte eine Bindestelle für den Rezeptor, erfolgte die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) nach einem *One-Site-Binding-Model*. Da die Daten gut gefittet werden konnten, erwies sich die Anwendung dieses Modells als berechtigt.

### 3. Methoden

#### 3.6.2. Sekundärstrukturanalyse

Die Analyse der Sekundärstruktur ausgewählter Aptamere erfolgte über das im Internet zur Verfügung stehende Programm *mfold web server* (Version 3.2) von Zuker [110].

#### 3.6.3. Analyse der Aptamerbindung mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Zur Verifizierung der Aptamerbindung wurde als weitere Methode die konfokale Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) gewählt. Sie bietet die Möglichkeit, in einem sehr kleinen Detektionsvolumen die Diffusion einzelner Moleküle in Lösung zu erfassen. Gemessen werden Intensitätsfluktuationen im Emissionskanal [111]. Ursache hierfür sind einzelne fluoreszierende Moleküle, die in das Detektionsvolumen hinein und heraus diffundieren. Die Intensitätsfluktuationen werden statistisch über Korrelationsanalysen erfasst, um so Informationen über die zugrunde liegenden Dynamiken, z. B. Diffusionszeiten, zu erhalten [112].

Für die FCS-Messungen wurde das ConfoCor2 der Firma Carl Zeiss verwendet. Die Aptamere 13-15\_D1 und 13-27\_D-T, sowie die Punktmutante 13-27\_D-T\_G6T wurden als fluoreszierende Oligonukleotide mit einem AlexaFluor<sup>®</sup> 488 Farbstoff an deren 3'-Ende von Invitrogen bezogen (Tab. 2.5).

Die Proben wurden mit einem Argon-Laser (5 mW) bei 25% Output und einer Transmission von 15% vermessen. Die Laserintensität wurde über ein AOTF (*acousto-optic tunable filter*) reguliert. Als Detektoren wurden Avalanche Photodioden (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer, Fremont USA) verwendet. Das Anregungslicht wurde über ein C-Apochromat 40x-Objektiv (1,2 NA Wasserimmersion) in die Probenebene fokussiert. Die Proben wurden durch den Laserstrahl angeregt. Das Emissionssignal wird durch dasselbe Objektiv eingesammelt und passiert den dichroitischen Strahlenteiler (Haupt-Farb-Teiler HFT 488). Zur zusätzlichen Abtrennung von Hintergrundlicht wurde ein Emissionsfilter (BP 505-550 nm) eingesetzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde schließlich zum Detektor geleitet. Das Pinhole wurde auf einen Durchmesser von 70 µm eingestellt. Die Messzeit betrug 10x 10 Sekunden. Der Strukturparameter wurde für die Messungen auf 5 festgelegt.

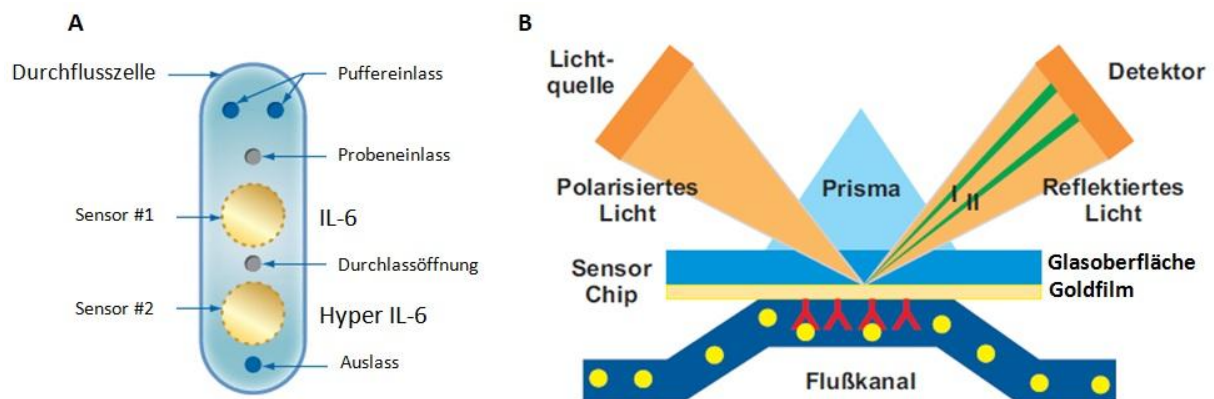
Zunächst wurden 20 nM des freien Aptamers in einem Volumen von 20 µL im Selektionspuffer A (Tab. 2.2) vermessen. Mit Hilfe der ConfoCor2 Software wurden die Daten der sich frei in Lösung befindenden Oligonukleotide, nach dem Ein-Komponenten-Modell ausgewertet und gefittet [113]. In Titrationsanalysen wurde das Hyper-IL-6 in 250 nM-Schritten in einem Volumen von 1,5 µL zu dem jeweilig vorgelegten DNA-Aptamer (20 nM) pipettiert und vermessen. Hierbei wurde das Zwei-Komponenten-Modell zur

### 3. Methoden

Auswertung verwendet [113]. Durch Fixierung der Diffusionsgeschwindigkeit der ersten Komponente, der des freien Aptamers, kann die Diffusionszeit der zweiten Komponente, also des Aptamer-Protein-Komplexes, ermittelt werden. Eine erniedrigte Diffusionsgeschwindigkeit deutet dabei auf eine Bindung der Aptamere an das Protein hin. Zur Berechnung der Dissoziationskonstante wurde das Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> verwendet.

#### 3.6.4. Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Oberflächen-Plasmonresonanz

Alle SPR-Biosensoren, so auch das hier verwendete SPR-2 System (SierraSensors GmbH) ermöglichen die Überwachung molekularer Wechselwirkungen zweier unmarkierter Moleküle in Echtzeit [114]. Dabei wird ein Interaktionspartner (hier: Hyper IL-6) auf eine mit Gold beschichtete Sensor-/Chipoberfläche immobilisiert und der andere Partner (Aptamer) in Lösung (Selektionspuffer A) über die Oberfläche geleitet. Eine Interaktion der Moleküle führt zur Veränderung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz die am Detektor gemessen wird (Abb. 1.1, B). Somit können wichtige Parameter wie z.B. die Assoziations- und Dissoziations-Rate, die Bindungsaffinität, sowie Thermodynamiken in Echtzeit verfolgt und ermittelt werden.



**Abb. 1.1: Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR).** **A)** Aufbau einer Durchflusszelle [nach [115]]. Ein Glasträger ist mit einer Goldschicht überzogen, welche mit einer funktionellen Interaktionsschicht versehen ist. Diese ermöglicht die kovalente Bindung von Biomolekülen in nicht-denaturierter Form. Dieser Sensorchip ist in einer Durchflusszelle installiert. Auf dem ersten Sensor wurde das IL-6, auf dem Zweiten das Zielprotein Hyper-IL-6 immobilisiert. **B)** Das SPR-Detektionsprinzip: Polarisiertes Licht einer Lichtquelle beleuchtet die Goldoberfläche unter einem bestimmten Winkel, so dass der Lichtstrahl total reflektiert wird. Ist ein Molekül (♣) auf der Goldoberfläche immobilisiert und kommt es zur Interaktion mit dem Liganden (●), so verändert sich die Oberflächen-Plasmon-Resonanz und kann am Detektor erfasst werden.

Auf einer Durchflusszelle mit zwei Sensoren wurden jeweils das IL-6 und Hyper-IL-6 wie in Abbildung 1.1 A gezeigt immobilisiert. Die PEG Interaktionsschicht des Sensorchips mit funktionalen Carboxylgruppen wurde durch eine 8 minütige Injektion eines Gemisches von 400 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamonopropyl)-carbodiimide) und 100 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert. Die Immobilisierung des IL-6 auf dem ersten Sensorchip,

### 3. Methoden

erfolgte durch eine 8 minütige Injektion einer 10 µg/mL Lösung bei einer Flussrate von 25 µL/min. Auf diese Weise konnten 658 RU IL-6 stabil auf dem Chip immobilisiert werden. Das Selbe wurde auch für das Hyper-IL-6 auf dem zweiten Sensor durchgeführt. Hier konnten 1282 RU Hyper-IL-6 am Chip gekoppelt werden. Freie Bindungsstellen wurden durch eine 6 minütige Injektion von Ethanolamin (1 M, pH 8,5) blockiert. Durch Spülen mit dem Selektionspuffer A, der ebenfalls als Laufpuffer diente, wurde eine Basislinie eingestellt. Das zu untersuchende Aptamer wurde in steigenden Konzentrationen (12 nM – 1000 nM) bei einer Fließgeschwindigkeit von 25 µL/min, für 2 Minuten in das Flusssystem appliziert. Anschließend wurde eine dreiminütige Injektion des Selektionspuffers A eingeleitet. Der Chip wurde schließlich durch Injektion von 10 µL HCl (100 mM) bei einer Fließgeschwindigkeit von 25 µL/min regeneriert. Die Signale der IL-6-Messzelle wurden global durch einen Langmuir 1:1 Bindungsmodell mit der Sierrasensor-Evaluationssoftware gefittet [115].

#### 3.7. CD-Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie ist eine häufig verwendete Methode zur Konformationsermittlung chiraler Verbindungen. Sie basiert auf dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten von links und rechts zirkular oder elliptisch polarisiertem Licht bestimmter Wellenlänge. Dabei sollte die Differenz der beiden Extinktionskoeffizienten (sogenannte Elliptizität  $\Theta$ ) für chirale Moleküle ungleich null sein. Dieses Verhalten wird als Zirkulardichroismus bezeichnet. Bei nicht-chiralen, d.h. optisch nicht aktiven Verbindungen ist die Differenz hingegen gleich null. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie lassen sich verschiedene Konformationen von G-Quadruplex-Strukturen darstellen. So erhält man im CD-Spektrum für eine anti-parallele Konformation ein charakteristisches positives Signal bei 290 nm und ein Negatives bei 260 nm, während für die parallele Konformation ein Maximum bei 260 nm und ein Minimum bei 240 nm charakteristisch sind [61, 66, 116].

Die CD-Messungen wurden am Aviv Instruments Circular Dichroism Spectrometer Model 215 bei 25 °C durchgeführt. In einem Volumen von 500 µL wurden Aptamer-Lösungen (5 µM) im jeweiligen, zu untersuchenden Puffersystem (480 µL) (Tab. 2.2) hergestellt und CD-Spektren im Bereich von 200 nm bis 320 nm aufgenommen. Die erhaltenen CD-Spektren ergeben sich aus den Mittelwerten zweier Scans.

#### 3.8. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zellbiologische Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

### 3. Methoden

Die Kultivierung der hier verwendeten Zelllinien, BAF/gp130 und BAF/gp130/IL6R/TNF erfolgte in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen á 5 mL im Brutschrank bei 37 °C. Als Kulturmedium diente DMEM, welches mit FKS (10%) und 1x PenStrep (Tab. 2.4) versetzt wurde. Zusätzlich wurde den BAF/gp130-Zellen Hyper-IL-6 (10 ng/mL) und den BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen das Zytokin IL-6 (10 ng/mL) sowie das Antibiotikum Puromycin (12 µg/mL) zugesetzt. Ohne den Stimulus durch das jeweilige Zytokin wären die Zellen nicht in der Lage, zu wachsen.

Um die Suspensionszellen dauerhaft in Kultur halten zu können, war es notwendig sie regelmäßig zu passagieren. Erreichte die Zellkultur eine gewisse Dichte, so wurde diese in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 500 g für 5 min zentrifugiert und wenige Mengen in frischem Medium resuspendiert.

#### **3.9. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein analytisches Verfahren, welches die simultane Erfassung mehrere physikalischer Eigenschaften von Einzelzellen, wie beispielsweise die relative Größe, Granularität oder Fluoreszenzintensitäten ermöglicht. Im Durchflusszytometer werden die in einer Lösung befindlichen fluoreszierenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, beeinflussen sie die Lichtstreuung. Ein Teil des Lichts wird emittiert und von einem Photodetektor registriert. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und Komplexität der Zelle. Man unterscheidet bei der Lichtstreuung zwischen Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches Auskunft über die Größe der Zelle gibt und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), das proportional zur Zellgranularität ist.

Ein dritter Parameter zur Charakterisierung der Zelle ist die relative Fluoreszenzintensität, die durch ein fluoreszierendes, an der Zelle gebundenes Molekül entsteht.

Die Analysen mittels Durchflusszytometrie erfolgten am FACScan der Firma Becton Dickinson. Zu Beginn wurden die Zellen auf ihre Größe bzw. Granularität analysiert. Wurde eine einheitliche Zellpopulation beobachtet, so konnte die Fluoreszenz der Zellen mit dem passenden Emmissionsdetektor detektiert werden. Für AlexaFluor<sup>®</sup> 488 markierte Oligonukleotide wurde der Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm genutzt und die Emission im FL-1 Kanal detektiert werden.

##### **3.9.1. Nachweis der IL-6R-Expression auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen**

Zum Nachweis des IL-6R auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen mittels Durchflusszytometrie, wurde ein IL-6R-spezifisches fluoreszenzmarkiertes RNA-Aptamer verwendet. Durch die geringe Stabilität der RNA-Aptamere in Serum-enthaltendem Medium

### 3. Methoden

[13] wurde die Analyse in Selektionspuffer A durchgeführt. Hierfür wurden BAF/gp130 und BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen geerntet (500 g für 5 min) und das Pellet in 5 mL DMEM Medium ohne FKS aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 500.000 Zellen einmal mit 500 µL Selektionspuffer A gewaschen, in 350 µL des gleichen Puffers resuspendiert und mit 10 pmol des fluoreszenzmarkierten RNA-Aptamers für 5 min inkubiert. Durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min wurden nicht gebundene RNA-Moleküle entfernt. Das Pellet wurde unter diesen Bedingungen zweimal mit 500 µL Selektionspuffer A gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in 350 µL Selektionspuffer A resuspendiert.

#### **3.9.2. Analyse der Bindung von ssDNA-Aptameren an BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen**

Die Analyse der Aptamerbindung erfolgte, wie für das RNA-Aptamer beschrieben (3.9.1). Jeweils 500.000 BAF/gp130- und BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen wurden mit Selektionspuffer A gewaschen und mit dem zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten ssDNA-Aptamer (Tab. 2.5) kurz inkubiert. Ungebundene DNA-Moleküle wurden durch Waschen entfernt. Das Zellpellet wurde für die durchflusszytometrische Analyse in Selektionspuffer A resuspendiert (3.9.1).

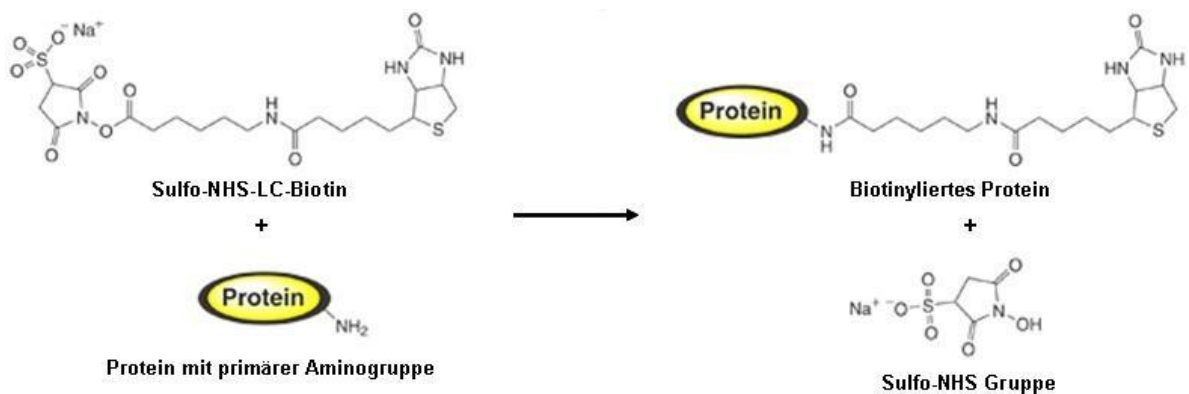
## 4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, DNA-Aptamere spezifisch für den Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) zu selektieren. Mittels *in vitro* Selektion, einem als SELEX bezeichneten zyklischen Prozess, erfolgte die Anreicherung von DNA-Aptameren aus einer kombinatorischen Oligonukleotid-Bibliothek. Der repetitive Zyklus setzte sich aus vier aufeinander folgenden Teilschritten zusammen: der Inkubation mit dem Zielmolekül, der Separation gebundener von ungebundenen Nucleinsäuremolekülen, der Elution gebundener Nucleinsäuren und deren Amplifikation. Der entscheidende Schritt dabei war die Selektion, bei der die bindenden Nucleinsäuremoleküle von den nicht bindenden getrennt wurden [92]. Zur Separation wurden magnetische mit Streptavidin beschichtete Partikel (Dynabeads®) eingesetzt. Hierbei machte man sich die starke Biotin-Streptavidin-Interaktion zur Immobilisierung des biotinylierten sIL-6R an die magnetischen Partikel zu Nutze.

### 4.1. Selektion von DNA-Aptameren mit Affinität für sIL-6R

#### 4.1.1. Biotinylierung des sIL-6R und Kopplung an Dynabeads® M-280

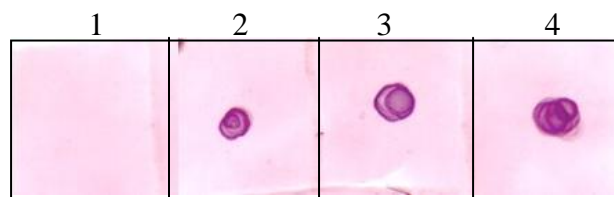
Eine wichtige Voraussetzung für die Selektion von DNA-Aptameren war, das Protein auf der Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten magnetischen Partikeln (Dynabeads®) zu immobilisieren. Hierfür wurde das Zielmolekül, der sIL-6R mittels EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotin-Reagenz (Pierce) biotinyliert. Das Reagenz ermöglicht eine effiziente Markierung von Proteinen an primären Aminogruppen (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Biotinylierungsreaktion von Sulfo-NHS-LC-Biotin mit primären Aminogruppen (modifiziert nach [117]).** Die aktivierte Sulfo-NHS-Gruppe des Biotinderivates greift die primären NH<sub>2</sub>-Gruppen (N-Terminus, Lysinreste) von Proteinen an. Unter Bildung stabiler Amidbindungen werden so Peptide oder Proteine biotinyliert.

#### 4. Ergebnisse

Über die aktivierte Sulfo-NHS-Gruppe eines N-Hydroxysulfosuccinimid-Esters erfolgt die Bindung des Biotins an primäre Amine, d.h. an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinseitenketten und an die N-Termini der Proteine. Der lange C-C Spacer (LC = long chain) des Sulfo-NHS-LC-Biotins verringert das Auftreten einer sterischen Hinderung. Da in wässrigen Lösungen die Hydrolysereaktion des NHS-Esters als Konkurrenzreaktion zur Aminierung abläuft [118], wurde zur Minimierung des Reaktionsverlustes das Reagenz unmittelbar vor Gebrauch frisch als wässrige Lösung hergestellt und in dreifach molarem Überschuss mit dem sIL-6R inkubiert (3.3.3). Mittels Dialyse (3.3.4) wurde überschüssiges Biotin abgetrennt und der Erfolg der Biotinylierung mit Hilfe eines DotBlots (3.3.5) kontrolliert (Abb. 4.2). Die Biotinmodifizierungen des sIL-6R werden hierbei mittels ExtrAvidin<sup>®</sup>, eines tetrameren Proteins, welches vier hoch affine Bindungsstellen für Biotin aufweist, nachgewiesen. Das Protein war mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert die das Substrat BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphat) umsetzt. Dabei wird NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu NBT-Diformazan reduziert und es kommt zu einem Farbumschlag.

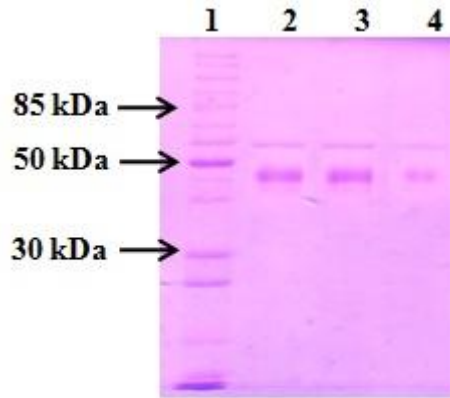


**Abb. 4.2: DotBlot zum Nachweis der Biotinylierung des sIL-6R.** Nach Bindung des Biotins an primäre Aminogruppen des sIL-6R mittels Sulfo-NHS-LC-Biotin, wurde der Biotin-Überschuss durch Dialyse entfernt. Der Nachweis der Biotinylierungsreaktion erfolgte mittels DotBlot unter Verwendung ExtrAvidin<sup>®</sup>-Alkalischer Phosphatase und des Substrats NBT-BCIP. 1: 0,34  $\mu$ g nicht biotinylierter sIL-6R; 2: 0,1  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R; 3: 0,2  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R; 4: 0,3  $\mu$ g biotinylierter sIL-6R.

Abbildung 4.2 zeigt den DotBlot. Aufgetragen wurden von links nach rechts, das nicht modifizierte Protein (Abb. 4.2, 1), was wie erwartet zu keiner Farbreaktion führte und der biotinylierte sIL-6R in steigenden Konzentrationen (Abb. 4.2, 2-4, purpurne Dots). Nach erfolgreicher Biotinylierung wurde zur Determination möglicher Protein-Degradationen eine SDS-PAGE (3.3.1) mit anschließender *Coomassie*-Färbung (3.3.2) durchgeführt. Auf ein SDS-PAA-Gel wurden neben dem *PageRuler*<sup>™</sup> *Unstained Protein Ladder*, der nicht modifizierte sIL-6R, sowie eine Probe an biotinyliertem sIL-6R vor und nach der Dialyse (Abb. 4.3) aufgetragen. Die Proteinbanden des biotinylierten sIL-6R (Abb. 4.3, Spuren 3 und 4, ~ 50 kDa) waren deutlich ohne Degradation erkennbar und entsprachen der Bande des unmodifizierten Proteins (Spur 2).



## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.3:** 15 %iges SDS-PAA-Gel zum Nachweis eventueller Degradation des biotinylierten sIL-6R. Zur Kontrolle möglicher Proteindegradation des sIL-6R nach Biotinylierung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Neben dem unmodifizierten sIL-6R, der als Referenz diente, wurde eine Probe des sIL-6R vor und nach Entfernung des Biotin-Überschusses durch Dialyse auf das Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*; 2: 1,0 µg nicht biotinylierter sIL-6R; 3: 1,0 µg biotinylierter sIL-6R, 4: 0,86 µg biotinylierter sIL-6R nach Dialyse.

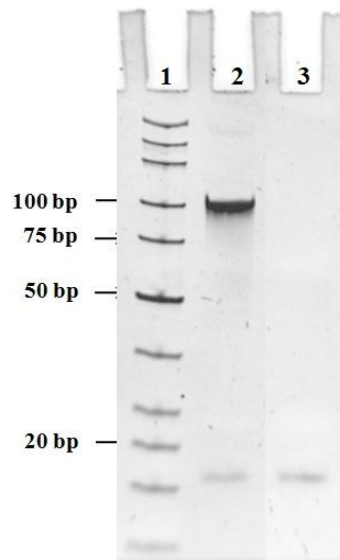
### 4.1.2. Selektion sIL-6R spezifischer DNA-Aptameren

Die Selektion sIL-6R spezifischer DNA-Aptamere wurde unter Verwendung magnetischer Partikel, auf deren Oberfläche das Zielprotein immobilisiert wurde, durchgeführt (3.4). Der für die Selektion verwendete Phosphat-Puffer wurde so gewählt, dass der pH-Wert im physiologischen Bereich lag und der Salzgehalt dem des menschlichen Körpers ähnelte. Dies könnte für spätere *in vivo* Anwendungen der Aptamere von großer Bedeutung sein.

In der ersten Selektionsrunde wurden 500 pmol der einzelsträngigen DNA-Bibliothek ( $3 \times 10^{14}$  Moleküle) mit dem an Dynabeads® immobilisierten sIL-6R inkubiert. Durch stringentes Waschen mit dem Selektionspuffer A (Tab. 2.2) wurden nicht-bindende DNA-Moleküle getrennt. Bindende DNA-Moleküle wurden durch Erwärmen (80°C) eluiert und anschließend mittels PCR amplifiziert (3.2.1). Nach jeder Selektionsrunde wurden zur Kontrolle die PCR-Ansätze auf ein 10%-iges natives PAA-Gel (3.1.1) aufgetragen und analysiert. Abbildung 4.4 zeigt exemplarisch Runde 3. Bereits nach neun PCR-Zyklen war eine deutliche Bande bei 101 bp zu erkennen (Abb. 4.4, Spur 2), während der Kontrollansatz ohne Template, wie erwartet, keine spezifische PCR-Bande zeigte (Spur 3).

Während der PCR wurde die DNA unter Verwendung eines 5'-biotinylierten reversen Primers. Die biotinylierte dsDNA wurde mit den Streptavidin beschichteten Dynabeads® inkubiert, so dass nach Zugabe von NaOH der biotinylierte Aptamerstrang mittels magnetischer Separation abgetrennt werden konnte. Nach Neutralisation mit KOH konnte die ssDNA in der nächsten Selektionsrunde eingesetzt werden.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.4: Analytisches 10%-iges natives PAA-Gel zur Kontrolle der PCR, beispielhaft für die 3. Selektionsrunde.** Die nach jeder Selektionsrunde eluierte DNA wurde mittels PCR zur dsDNA einer Länge von 101 bp amplifiziert. 1: *Ultra Low Range DNA-Ladder*; 2: dsDNA nach 9 PCR-Zyklen der Selektionsrunde 3; 3: Kontrollansatz der PCR ohne DNA-Template. Die Detektion erfolgte mittels Ethidiumbromid.

Um folgend den Selektionsdruck zu verstärken, wurden mit jeder Selektionsrunde die Waschschritte erhöht. Zusätzlich sollte ab Runde drei eine Reduktion der eingesetzten Mengen sowohl an DNA als auch an immobilisiertem Protein um 1/5 zur Stringenz beitragen. In Tab. 4.1 sind die wichtigsten Charakteristika der einzelnen Selektionsrunden zusammengefasst.

**Tab. 4.1: SELEX-Runde 1-13 in der Übersicht.**

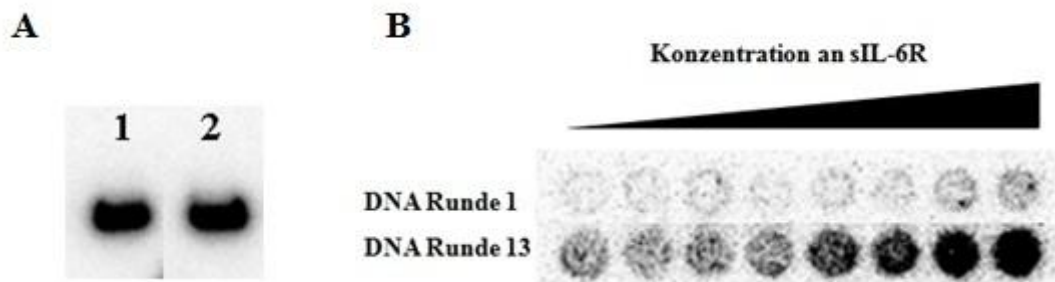
Runde	eingesetzte ssDNA-Menge	eingesetzte sIL-6R Menge	Waschschritte	PCR-Zyklen
1	500 pmol	108 pmol	1 x 100 µL	14
2	20 pmol	108 pmol	1 x 200 µL	9
3	4 pmol	21 pmol	2 x 200 µL	9
4	4 pmol	21 pmol	3 x 200 µL	8
5	4 pmol	21 pmol	4 x 200 µL	7
6	4 pmol	21 pmol	5 x 200 µL	7
7	4 pmol	21 pmol	6 x 200 µL	7
8	4 pmol	21 pmol	7 x 200 µL	6
9	4 pmol	21 pmol	8 x 200 µL	6
10	4 pmol	21 pmol	9 x 200 µL	6
11	4 pmol	21 pmol	10 x 200 µL	6
12	4 pmol	21 pmol	11 x 200 µL	6
13	4 pmol	21 pmol	12 x 200 µL	6

## 4. Ergebnisse

Nach 13 Selektionsrunden sollten sich affine Moleküle angereichert haben und die Komplexität des Ausgangspools gesunken sein. Um dies zu untersuchen wurde die angereicherte DNA-Bibliothek der Selektionsrunde 13 und der unselektierte DNA-Pool aus Runde 1 in ersten Filterbindungsstudien (3.6.1) analysiert.

### 4.2. Erste Filterbindungsstudien: Anreicherung von Aptameren?

Nach 13 Selektionsrunden wurden erste Filterbindungsstudien unter radioaktiven Bedingungen durchgeführt. Dies sollte Aufschluss über eine mögliche Affinität der selektierten ssDNA für das Zielmolekül sIL-6R geben. Hierfür wurden die DNAs aus den Selektionsrunden 1 und 13 amplifiziert (3.2.1), einer Strangtrennung (3.2.3) unterzogen und in einer anschließenden PNK-Reaktion am 5'-Ende mit  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP radioaktiv markiert (3.2.4). Die Reaktionsansätze wurden über ein 10%-iges denaturierendes PAA-Gel gereinigt, eluiert, einer Ethanol-Fällung (3.1.7) unterzogen und zur Kontrolle der Markierung erneut auf ein 10%-iges denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Abbildung 4.5 A zeigt die erfolgreiche Markierung der ssDNA aus den Selektionsrunden 1 (Spur 1) und 13 (Spur 2). Die Visualisierung der Banden erfolgte am PhosphorImager mittels Autoradiographie. Die verwendete Nummerierung bezieht sich stets auf die DNA der jeweils beendeten Selektionsrunde.

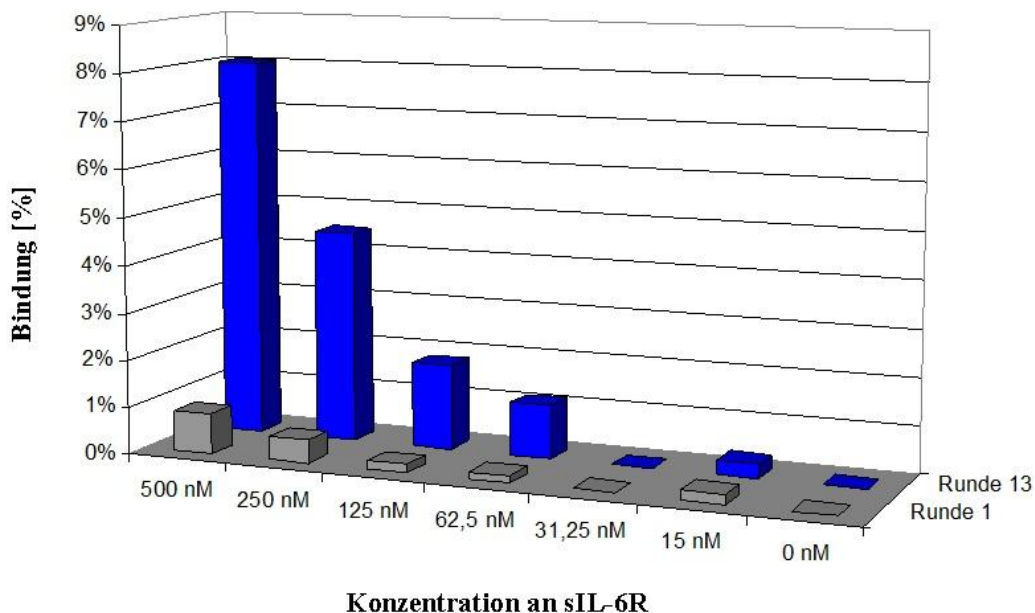


**Abb. 4.5: Radioaktive Markierung der DNA aus den Selektionsrunden 1 und 13 und anschließende Filterbindungsstudie an sIL-6R.** A) Gezeigt sind die ssDNA der Selektionsrunden 1 (Spur 1) und 13 (Spur 2) nach radioaktiver Markierung mittels PNK-Reaktion unter Verwendung von  $\gamma$  $^{32}$ -P-ATP aufgetragen, auf ein 10%-iges denaturierendes PAA-Gel. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie am PhosphorImager. B) Für die Filterbindungsstudie wurde die jeweilige radioaktiv markierte ssDNA (< 0,5 nM) mit steigenden Konzentrationen (0 – 500 nM) an sIL-6R inkubiert. Die nach Filtration durch eine Nitrozellulosemembran verbleibende Menge an radioaktiv markierten, bindenden ssDNA-Molekülen wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Die radioaktiv markierten DNAs (< 0,5 nM) wurden mit dem Zielmolekül in steigenden Konzentrationen (0 nM – 500 nM) inkubiert. Zur Trennung der ungebundenen von den bindenden DNA-Molekülen wurden die Ansätze über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Diese bindet unspezifisch Proteine, so dass DNA-Moleküle die an das Protein gebunden

#### 4. Ergebnisse

haben ebenfalls von der Membran zurückgehalten werden (Abb. 4.5, B) [92, 119, 120]. Durch stringentes Waschen mit dem Selektionspuffer A wurden zusätzlich nicht bindende DNA-Moleküle abgetrennt. Um eine unspezifische Interaktion der DNA mit der Membran zu minimieren, wurde die Nitrozellulosemembran vor der Filtration mit KOH-behandelt [121, 122]. Die verbliebene Menge der radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde mittels Autoradiographie (3.1.5) detektiert und bestimmt. Zur Bestimmung der prozentualen DNA-Bindung wurde eine definierte Menge an markiertem Aptamer (100 %) auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. So konnte der Anteil bindender DNA-Moleküle ermittelt werden. In Abbildung 4.6 sind die prozentualen Anteile an den sIL-6R gebundene DNA der Selektionsrunden 1 und 13 graphisch dargestellt.



**Abb. 4.6: Bindung der ssDNA aus den Selektionsrunden 1 und 13 an sIL-6R.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an gebundener DNA bei definierten sIL-6R-Konzentrationen. Die DNA-Bibliothek der Selektionsrunde 13 ließ eine konzentrationsabhängige Bindung an den sIL-6R erkennen. Die gezeigten Messbalken geben sich aus den Mittelwerten zweier unabhängiger Experimente wieder. (Durchführung wie in Abb. 4.5).

Die Filterbindungsstudie und deren Auswertung (Abb. 4.5, Abb. 4.6) ließen eine konzentrationsabhängige Bindung der DNA-Bibliothek aus Runde 13 an das Protein sIL-6R erkennen. Im Vergleich dazu, zeigte der unselektierte DNA-Pool der Runde 1 keine Affinität zum sIL-6R (< 1% Bindung). Es konnte davon ausgegangen werden, dass eine Anreicherung bindender Nukleinsäuremoleküle während der 13 Selektionsrunden stattgefunden hatte. Zur Charakterisierung darin enthaltener Aptamere, wurde die DNA-Bibliothek der Selektionsrunde 13 kloniert und sequenziert.

## 4. Ergebnisse

### 4.3. Klonierung und Sequenzierung angereicherter DNA-Aptamere

Nach 6 bis 20 iterativen Selektionszyklen erhält man gewöhnlich eine mit vor allem bindenden Nukleinsäuremolekülen angereicherte DNA-Bibliothek. Die nach 13 Selektionsrunden erhaltene angereicherte DNA-Bibliothek setzte sich aus verschiedenen DNA-Molekülen unterschiedlicher Sequenzen für den sIL-6R zusammen. Um die darin enthaltenen monoklonalen Aptamere zu identifizieren wurde die DNA-Bibliothek der Runde 13 in den pUC19 Vektor kloniert (3.5). Die Sequenzierung (3.5.7) 18 ausgewählter Klone ergab 18 unterschiedliche Sequenzen (Anhang). In Abbildung 4.7 ist das Alignment von fünf selektierten Aptamere, die eine auffällige gemeinsame, Guanin-reiche Konsensussequenz: 5'-GGGT<sub>1-3</sub>GGGYGGGTGGGW-3' aufwiesen, dargestellt, wobei Y für Thymin oder Cytosin bzw. W für Thymin oder Adenin stehen kann.

```
13-32      ----TAAATCGG-CGCCGGGT--GGGCGGGTGGGTAG-TAGCGCTGAGTGGGTAAGGGTATCGTGGG--
13-27      GAAGGACACGGT-TTAGGGGT--GGGTGGGTGGGTAGC-TACCGGTGCCTTGGTTGGGG----GTGGG--
13-11      -----GCATTGGGGGGT-TGGGTGGGTGGGA-TATGCGTCAATGGTTTTTAACAAGGCGATACGGCA
13-15      CTTCAACGTACTCCCGGGGGT-TGGGTGGGTGGGTATCGG-GAGTAGGCCGCAACTGCCTG-----
13-5       -----CTAGGTGATTTGGGT--GGGCGGGTGGGTCAACATAGGTAATTACGCGATTGACAGGCTTC---
Konsensus      GGGT--GGC*GGGTGGG*
```

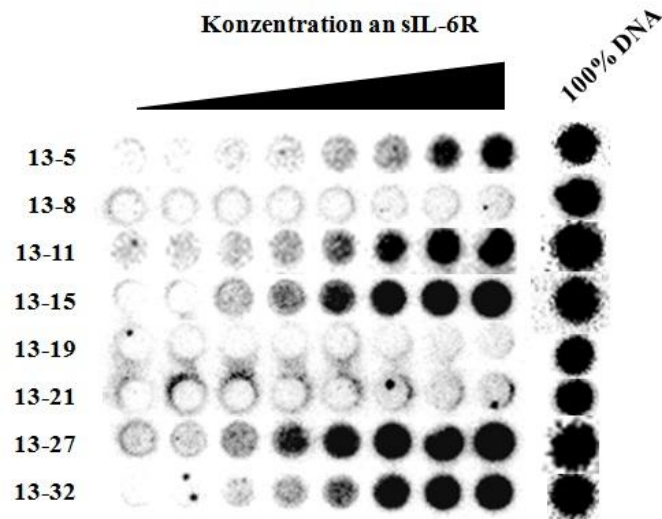
**Abb. 4.7: Sequenzvergleich ausgewählter monoklonaler Aptamere der angereicherten DNA-Bibliothek nach der Selektionsrunde 13.** Gezeigt ist die 60 Nukleotide lange randomisierte Sequenz in 5' - 3'-Richtung der fünf G-reichen Aptamere. Die in blauen Lettern dargestellten Basen sind in allen Sequenzen identisch, rot hervorgehoben sind die variablen Nukleotide. Die Bezeichnung der Aptamere setzt sich aus zwei Nummern zusammen: der Selektionsrunde (erste Zahl) und dem jeweiligen Klon (zweite Zahl).

### 4.4. Analyse der sIL-6R-spezifischen DNA-Aptamere

#### 4.4.1. Filterbindungsstudien monoklonaler sIL-6R-bindender DNA-Aptamere

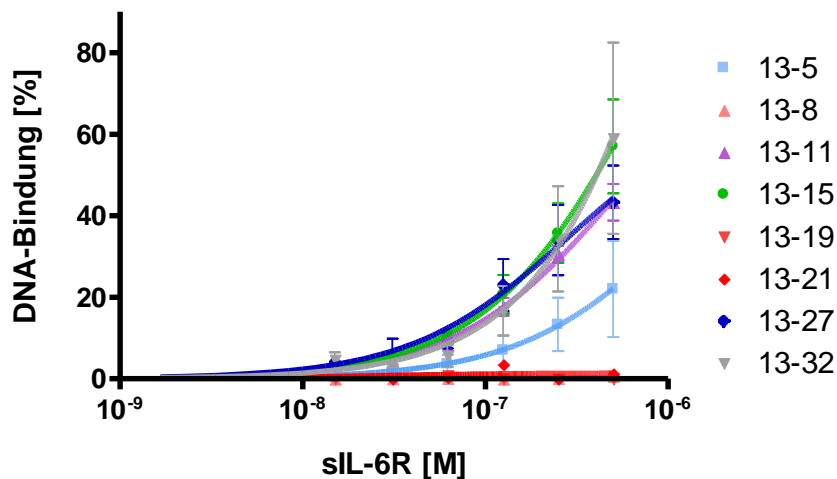
Alle fünf Aptamere mit dem auffälligen G-reichen Motiv in der Sequenz, 13-5, 13-11, 13-15, 13-27 und 13-32 wurden zur Analyse der Bindung an den sIL-6R mittels Filterbindungsstudien (3.6.1) herangezogen. Zusätzlich wurden drei weitere Klone (13-8, 13-19 und 13-21), welche dieses Motiv nicht enthielten mit getestet. Die nach der Filterbindungsstudie auf der Nitrozellulosemembran verbliebene Menge an radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde am PhosphorImager quantifiziert und zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) herangezogen. Zur Bestimmung der prozentualen DNA-Bindung wurde eine definierte Menge an markiertem Aptamer (100 %) auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Abbildung 4.8 zeigt exemplarisch eine Filterbindungsstudie mit allen G-reichen Aptameren.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.8: Filterbindungsstudie selektierter Aptamere an sIL-6R.** Das sIL-6R Protein wurde in steigenden Konzentrationen (0 – 1  $\mu$ M) mit der jeweiligen, radioaktiv markierten ssDNA (< 0,5 nM) inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Dargestellt sind die mittels Autoradiographie detektierten auf der Membran verbliebenen Mengen markierter DNAs. Als Referenz wurde eine definierte Menge (100 %) an radioaktiv markierter DNA aufgetragen.

In den Filterbindungsstudien konnte eine Zunahme in der Intensität der schwarzen Dots mit steigenden sIL-6R Konzentrationen für alle fünf G-reichen Aptamere beobachtet werden. Die verbliebene radioaktiv markierte ssDNA auf der Membran wies auf eine Aptamerbindung hin. Für die Nukleinsäuren 13-8, 13-19 und 13-21 konnte keine Bindung an den sIL-6R beobachtet werden, was auf eine Spezifität der G-reichen DNA-Moleküle hindeutete. Die Daten dieser Filterbindungsstudie sind in Abbildung 4.9 graphisch dargestellt.



**Abb. 4.9: Bindung der Aptamere 13-5, 13-11, 13-15, 13-27 und 13-32 an sIL-6R.** In Filterbindungsstudien ermittelter prozentualer Anteil an gebundener DNA in Abhängigkeit von der sIL-6R-Konzentration (logarithmische Auftragung). Gezeigt sind die Mittelwerten und Fehlerbalken aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

#### 4. Ergebnisse

Es konnte in drei unabhängigen Messungen gezeigt werden, dass alle fünf G-reichen DNA-Aptamere den sIL-6R binden konnten. Der Anteil an maximaler DNA-Bindung sowie die ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Der Anteil an maximaler Bindung beschreibt die Menge an ssDNA, die an den sIL-6R gebunden vorliegt. Dieser Wert liegt theoretisch bei 100%. Ist beispielsweise ein Teil der DNA nicht korrekt gefaltet oder degradiert, oder bindet das Protein nicht an die Nitrozellulosemembran, verringert sich dieser Wert. Durch die Annahme, jedes Aptamer hätte eine Bindestelle für den Rezeptor, erfolgte die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) nach einem *One-Site-Binding-Model*. Da die Daten gut gefittet werden konnten erwies sich die Anwendung dieses Modells als berechtigt.

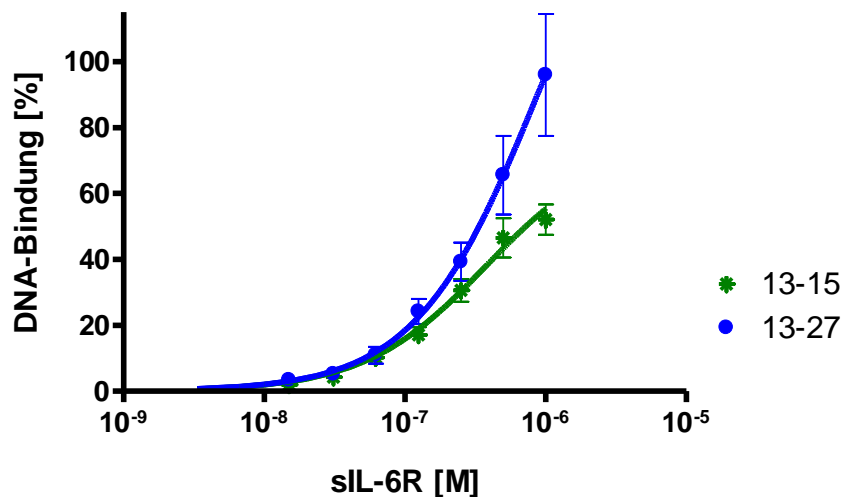
**Tab. 4.2: Charakteristika der 5 G-reichen *full length* Aptamere 13-5, 13-11, 13-15, 13-27 und 13-32.** Zusammengefasst ist der Anteil an maximal gebundener DNA sowie die Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) ermittelt in drei unabhängigen Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding-Modells*.

Aptamer	Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]
13-5	73,5 ± 126	1163 ± 2638
13-11	88,5 ± 14,9	507,3 ± 141
13-15	100,0 ± 31	434 ± 235
13-27	69,5 ± 19	284 ± 156
13-32	100,0 ± 67	473 ± 536

Bis auf den  $K_d$ -Wert des Aptamers 13-5 lagen die Dissoziationskonstanten der anderen vier Aptamere, im Bereich einer Größenordnung, zwischen 280 nM und 500 nM. Dabei zeigte das Aptamer 13-27 mit einem  $K_d$ -Wert von 284 ± 156 nM die höchste Affinität zum sIL-6R. Für die weitere Charakterisierung der Aptamerbindung wurden die Aptamere 13-15 und 13-27 herangezogen. Zunächst wurden eine Vielzahl an Bindungsstudien durchgeführt um die Dissoziationskonstante mit möglichst geringer Standardabweichung angeben zu können (Abb. 4.11).

Nach sieben voneinander unabhängigen Messungen konnten für das Aptamer 13-27 eine Dissoziationskonstante von 331 ± 132 nM und der Anteil an maximaler Aptamer Bindung von 100% ermittelt werden. Für das Aptamer 13-15 wurde ein  $K_d$ -Wert von 381 ± 91,4 nM und der Anteil an maximaler DNA-Bindung von 76,4 ± 9% berechnet.

## 4. Ergebnisse



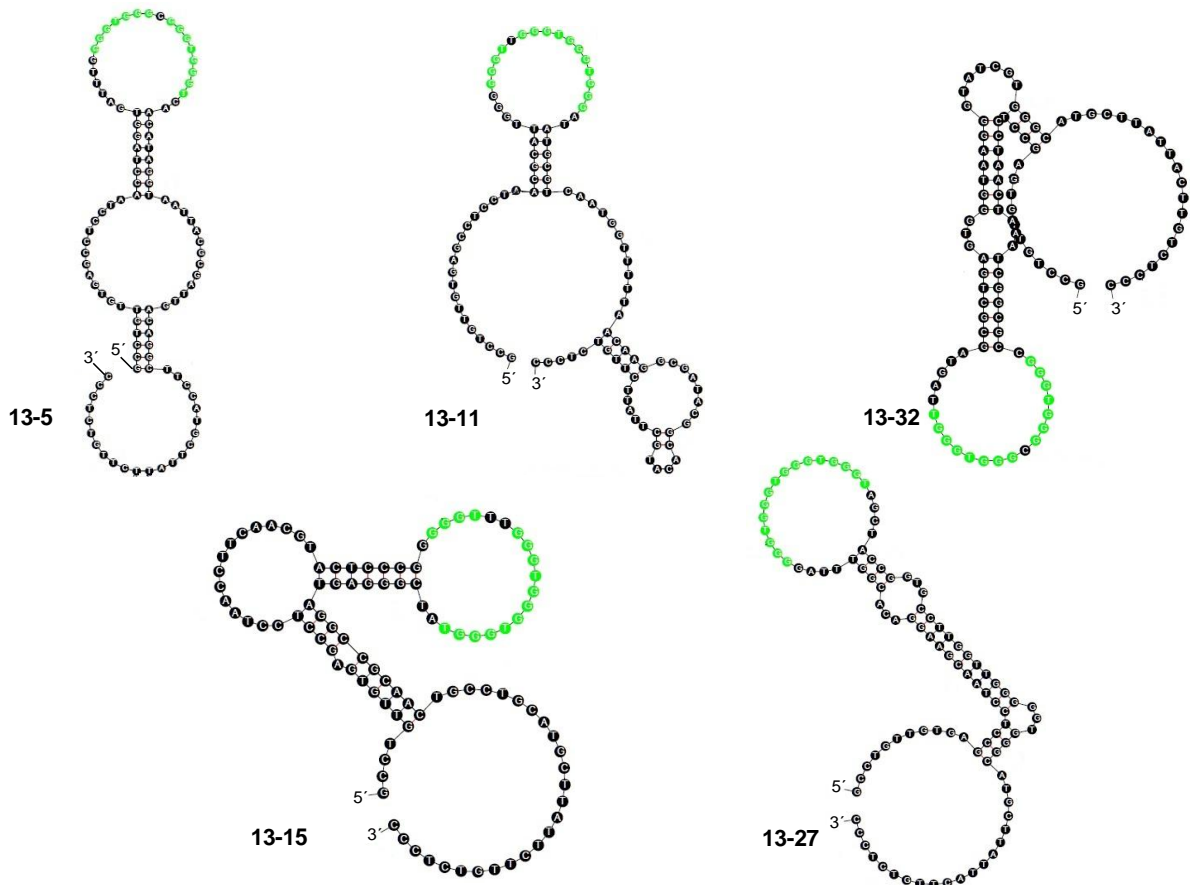
**Abb. 4.10: Bindung der Aptamere 13-15 und 13-27 an den sIL-6R.** In Filterbindungsstudien ermittelter prozentualer Anteil an gebundener DNA in Abhängigkeit von der sIL-6R-Konzentration (logarithmische Auftragung). Gezeigt sind Mittelwerten und Fehlerbalken aus sieben voneinander unabhängigen Experimenten.

### 4.4.2. Sekundärstrukturanalysen (mfold)

Die Sekundärstruktur-Vorhersagen erfolgten für alle fünf G-reichen DNA-Aptamere mit dem Programm *mfold web server* (Version 3.2), welches 2003 von Michael Zuker ins Internet gestellt wurde [110]. Das Ziel des Web-Servers ist der schnelle Zugriff zur RNA- und DNA-Faltung. Das Programm berechnet die mögliche Faltung einzelsträngiger Nukleinsäuren durch eine Energie-Minimierungs-Methode unter der Berücksichtigung von Haarnadelstrukturen und Blasen (Stems, Loops und Bulges). Aussagen über komplexe Tertiärstrukturen, wie es beispielsweise G-Quadruplexe sind, können während der Sekundärstrukturanalyse nicht gemacht werden. Ein G-Quadruplex ist definiert als eine lipophile, viersträngige Struktur, die durch die Interaktion mehrerer vertikal gestapelter Guanin-Tetraden, den sogenannten G-Quartetten entstehen kann. Diese G-Quartette sind durch Selbstorganisation von Guanosinen an monovalenten Kationen gebildete Makrozyklen, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Die G-reiche Konsensussequenz der selektierten Aptamere ließ vermuten, dass sich hier intramolekulare G-Quadruplexe ausbilden können. Für die Vorhersage der Sekundärstrukturen mit Hilfe des *mfold web server*, wurde für die Aptamere 13-5 und 13-32 die Bedingung festgelegt, dass der konservierte Bereich keine Basenpaarung eingehen darf. So lag nun das Konsensusmotiv aller Aptamere als Loopstruktur vor, die jeweils von einem doppelsträngigen Stamm stabilisiert wurde (Abb. 4.11, grün).



## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.11: Sekundärstruktur-Vorhersage der fünf G-reichen den sIL-6R bindenden DNA-Aptamere unter Verwendung des Programms *mfold web server* [110]. Dargestellt ist jeweils die energetisch günstigste Sekundärstruktur der Aptamere - für 13-5 und 13-32 erfolgte die Einschränkung, dass innerhalb der G-reichen Region keine Basenpaarung erfolgen soll. Die ersten 20 am 5'- bzw. letzten 21 Nukleotide am 3'- Ende sind jeweils die konstanten Regionen der Aptamere. Farblich hervorgehoben (grün) sind die konservierten Nukleotide der G-Reichen Sequenz innerhalb des Konsensusmotivs.**

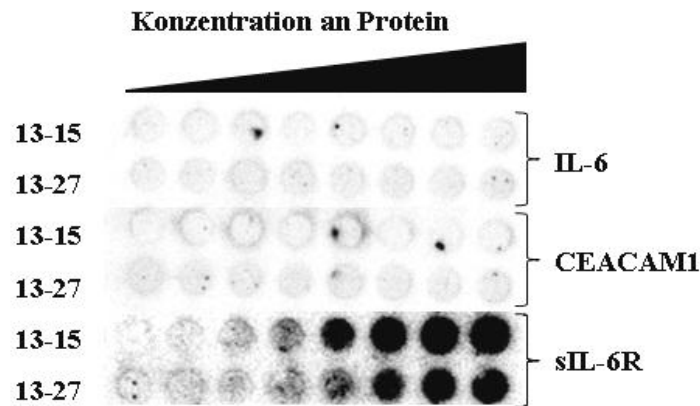
### 4.4.3. Untersuchung der Aptamerspezifität

Neben der Affinitätsbestimmung sollte die Spezifität der Aptamerbindung untersucht werden. Dazu wurden die sIL-6R-affinen DNA-Aptamere auf eine Interaktion mit zwei rekombinanten Kontrollproteinen analysiert. Als Kontrollprotein wurde zum einen der natürlich vorkommende Ligand des Rezeptors, Interleukin-6 (IL-6) gewählt, zum anderen CEACAM1, ein Zelladhäsionsmolekül, welches analog zum sIL-6R einen His-Tag trug. Beide Kontrollproteine sollten keine Wechselwirkung mit den selektierten sIL-6R-spezifischen Nukleinsäuren eingehen.

Zur Analyse der Spezifität wurden steigende Konzentrationen (0 – 1  $\mu\text{M}$ ) an IL-6 bzw. CEACAM1 mit den jeweiligen radioaktiv markierten Aptameren 13-15 und 13-27 inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert (Abb. 4.12). Als Positivkontrolle wurde je ein Ansatz mit dem sIL-6R mitgeführt. Die verbliebene Menge radioaktiv markierte ssDNA auf der Membran korreliert mit einer Bindung der markierten Aptamere an das Protein. Die

## 4. Ergebnisse

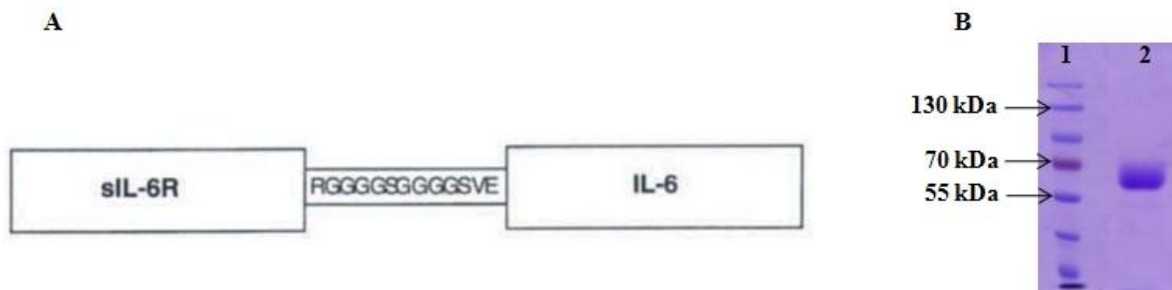
Positivkontrolle wies, wie schon vorher gezeigt, eine konzentrationsabhängige Bindung an den sIL-6R auf. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion der DNA-Aptamere mit den untersuchten Kontrollproteinen beobachtet werden (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Filterbindungsstudie zur Untersuchung der Spezifität der Aptamere 13-15 und 13-27.** Für die Filterbindungsstudie wurde das zu untersuchende Protein in steigenden Konzentrationen (0 – 1  $\mu$ M) mit der jeweiligen, radioaktiv markierten DNA (< 0,5 nM) inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Dargestellt sind die mittels Autoradiographie detektierten auf der Membran verbliebenen Mengen markierter ssDNA. Es konnte keine Bindung der Aptamere an IL-6 bzw. CEACAM1 detektiert werden.

### 4.4.4. Interaktion der Aptamere 13-15 und 13-27 mit Hyper-IL-6

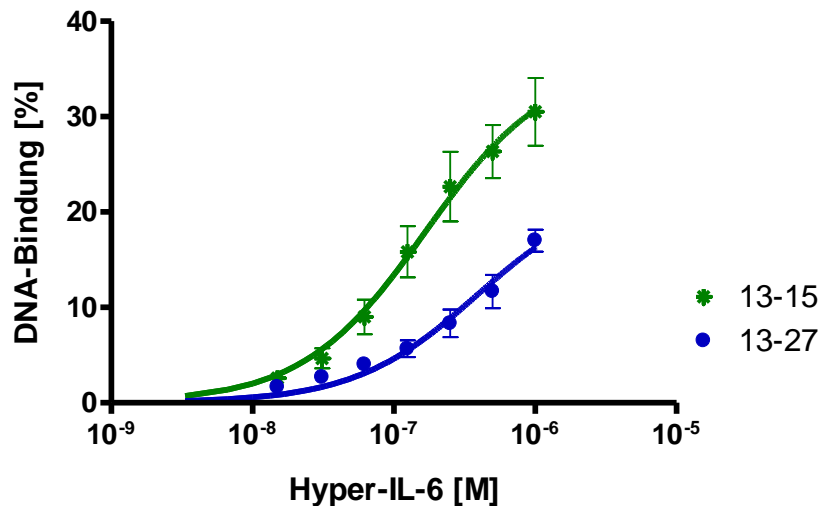
Für die weitere Charakterisierung der Aptamerbindung wurde das „Designer-Zytokin“ Hyper-IL-6 verwendet. Es handelt sich dabei um das biologisch hoch aktive Fusionsprotein bestehend aus IL-6 und dem sIL-6R. Dazu wurde gentechnisch der N-terminale Rest des IL-6 über einen flexiblen, 13 AS langen Peptidlinker C-terminal an den sIL-6R fusioniert (Abb. 4.13, A; 1.1.3) [14]. Durch das Vorhandensein der Domänen des sIL-6R bot sich das Hyper-IL-6 als geeignete Alternative an. Da es sich in höheren Ausbeuten produzieren ließ, wurde dieses für folgende Untersuchungen herangezogen und freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern in Kiel zur Verfügung gestellt.



**Abb. 4.13: Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.** A) Schematische Darstellung des Fusionsproteins Hyper IL-6. Der N-Terminus des IL-6 wurde über einen flexiblen, 13 AS langen Peptidlinker an den verkürzten C-Terminus des sIL-6Rs fusioniert [14]. B) Hyper-IL-6 wurde zur Kontrolle auf ein 7,5%-iges SDS-PAA-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. 1) *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*, 2) 2,85  $\mu$ g Hyper-IL-6 (56,9 kDa).

#### 4. Ergebnisse

Bevor die Aptamere weiter charakterisiert werden konnten, musste deren Bindung an das Hyper-IL-6 nachgewiesen werden. Vor der Durchführung der Bindungsstudien an Hyper-IL-6 wurde das Protein mittels SDS-PAGE kontrolliert. Dabei zeigte das Hyper-IL-6 (Abb. 4.13, B, Spur 2) eine charakteristische Bande bei entsprechendem Molekulargewicht ( $\sim 57$  kDa). Um die sIL-6R-spezifischen ssDNA-Aptamere weiter charakterisieren zu können, musste die Affinität der Nukleinsäuren für das Hyper-IL-6 bestimmt werden. Hierfür wurden die radioaktiv markierten DNA-Aptamere jeweils mit steigenden Konzentrationen an Hyper-IL-6 ( $0 - 1 \mu\text{M}$ ) im SelektionspufferA (Tab. 2.2) inkubiert und schließlich über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Die auf der Membran verbliebene radioaktiv markierte ssDNA wurde mittels PhosphorImager quantifiziert und zur Ermittlung der  $K_d$ -Werte herangezogen. Die Auswertung dieser Filterbindungsstudien ist in Abbildung 4.14 graphisch zusammengefasst.



**Abb. 4.14: Bindung der Aptamere 13-15 und 13-27 an Hyper-IL-6.** In Filterbindungsstudien ermittelter prozentualer Anteil an gebundener DNA in Abhängigkeit von der sIL-6R-Konzentration (logarithmische Auftragung). Gezeigt sind Mittelwerten und Fehlerbalken aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Anhand dieser Filterbindungsstudie konnte gezeigt werden, dass beide untersuchten DNA-Aptamere das Hyper-IL-6 binden konnten und zum sIL-6R vergleichbare Bindungseigenschaften aufwiesen (Abb. 4.14). Nach sechs unabhängigen Studien für das Aptamer 13-15 konnte eine Dissoziationskonstante von  $167 \pm 43,3$  nM, für das Aptamer 13-27 nach 3 unabhängigen Experimenten von  $388 \pm 99,9$  nM ermittelt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aptamere mit einer anderen Region des Rezeptors interagieren als IL-6.

## 4. Ergebnisse

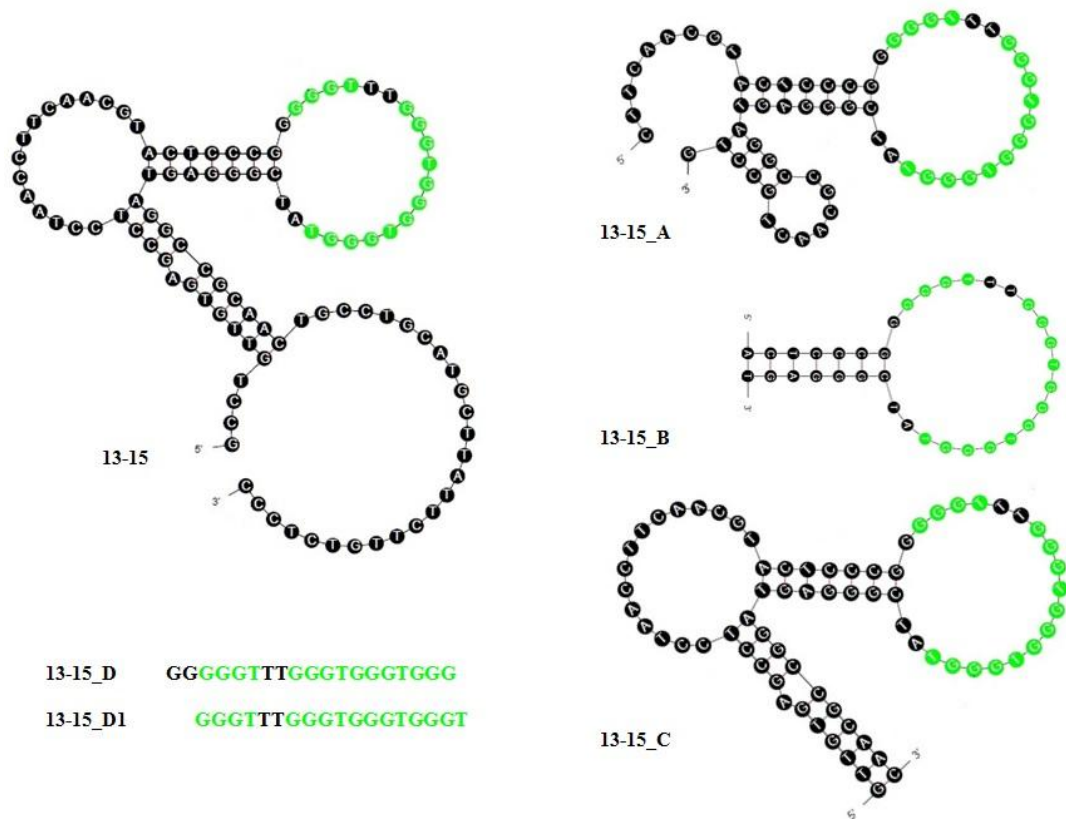
### 4.5. Minimalmotivsuche der Aptamere 13-15 und 13-27

Zur Identifikation einer möglichst kurzen Nukleinsäure mit ebenfalls spezifischen und affinen Bindungseigenschaften für den sIL-6R, wurden die Aptamere 13-15 und 13-27 in mehreren Schritten verkürzt.

#### 4.5.1. Verkürzung der Aptamere

Bei der konservierten G-reichen Region (5'-GGGT<sub>1-3</sub>GGGYGGGTGGGW-3') der selektierten Aptamere lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein putatives Bindemotiv handeln könnte. Erste Filterbindungsstudien mit Nukleinsäuren die diese Region nicht aufwiesen (13-8, 13-19 und 13-21) und keine Affinitäten zu dem Rezeptor zeigten, bekräftigten diese Annahme (Abb. 4.8). Durch das gehäufte Vorkommen von Guaninbasen in dieser Anordnung konnte ein Bindemotiv in Form von G-Quadruplexen angenommen werden. Mit Hilfe der Sekundärstruktur-Vorhersage (*mfold*, [110]) wurden die Aptamere 13-15 und 13-27 in mehreren Schritten so verkürzt, dass sie mindestens das G-reiche Bindemotiv beinhalteten (Abb. 4.15 und 4.17). Das Aptamer 13-15 wurde zunächst zu einem 60mer (13-15\_A) verkürzt, wobei auf die konstanten Primerbereiche verzichtet wurde. Die weiter verkürzte DNA 13-15\_B (35 nt) beinhaltete neben der G-reichen Region einen doppelsträngigen Stamm aus 7 Basenpaaren. Die Verkürzung, die zu der DNA 13-15\_C (71 nt) führte, war durch das Vorhandensein eines weiteren Loops, welcher zwei doppelsträngige Bereiche voneinander trennte charakterisiert. Zur Determination eines Minimalmotivs wurden zusätzlich zwei Varianten der G-reichen Region untersucht. Dabei unterschieden sich die beiden Varianten in der Anzahl an Nukleobasen die das konservierte Motiv 5'-GGGT<sub>1-3</sub>GGGYGGGTGGGW-3' flankierten. So war die Variante 13-15\_D durch das Vorhandensein zweier Guaninbasen am 5'-Ende charakterisiert. Zusätzlich fehlte dieser Variante der 3'-endständige Thyminrest. 13-15\_D1 wurde um die zwei 5'-endständigen Guaninbasen verkürzt, so dass dies letztlich zum Konsensusmotiv führte. Der Abbildung 4.15 sind die Sequenzen aller verkürzten Varianten des Aptamers 13-15 und dazugehörige Sekundärstruktur-Vorhersage zu entnehmen.

#### 4. Ergebnisse



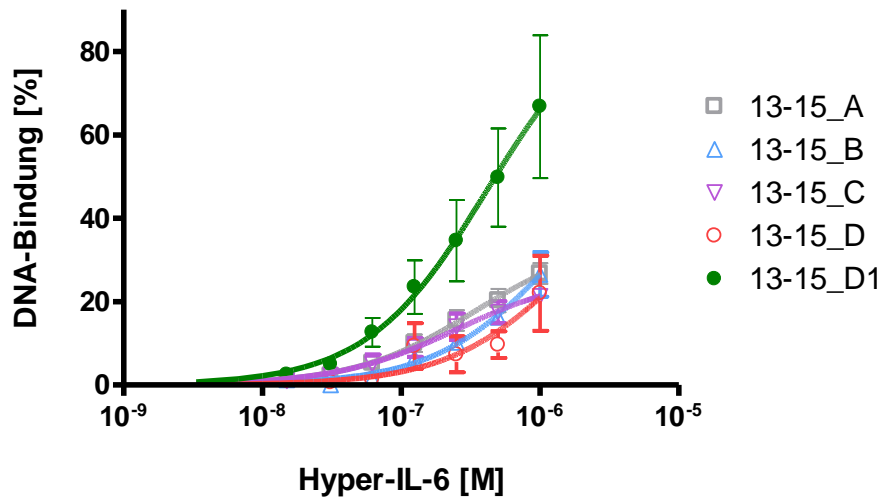
Aptamer [nt]	Sequenz
13-15_A [60]	CTTCAACGTA <del>CTTCCCGGGGGTTGGGTGGGTGGGT</del> ATCGGGAGTAGGCCGCAACTGCCTGCA
13-15_B [35]	ACTCCCGGGGGTTGGGTGGGTGGGTATCGGGAGT
13-15_C [71]	GTTGTGAGCCTGGTAACCTTCAACGTA <del>CTTCCCGGGGGTTGGGTGGGTGGGT</del> ATCGGGAGTAGGCCGCAAC
13-15_D [19]	GGGGGTTGGGTGGGTGGG
13-15_D1 [18]	GGGTTGGGTGGGTGGGT

**Abb. 4.15: Verkürzungen des Aptamers 13-15 anhand von Sekundärstruktur-Vorhersagen mittels *mfold web server* [110]. Oben: *full length* Aptamer 13-15 und die jeweiligen vorhergesagten Sekundärstrukturen der verkürzten Varianten 13-15\_A, 13-15\_B, 13-15\_C, sowie die Sequenzen der zwei Varianten der G-reichen Region, 13-15\_D und 13-15\_D1. Konservierte Basen der G-reichen Region, die in allen Verkürzungen erhalten blieb, sind grün hervorgehoben. Unten: DNA-Sequenzen der verkürzten Aptamer-Varianten in 5′-3′-Richtung.**

Die Bindungseigenschaften der verkürzten DNA-Varianten wurden mittels Filterbindungsstudien analysiert (Abb. 4.16). Dabei zeigten drei der fünf getesteten Nukleinsäuren ähnliche Affinitäten zum Zielprotein, im Vergleich zum ursprüngliche *full length* Aptamer 13-15. Für die Variante 13-15\_A, die durch das Fehlen der Primerregionen charakterisiert ist, konnte ein  $K_d$ -Wert von etwa 343 nM ermittelt werden (Tab. 4.3). Eine Dissoziationskonstante von etwa 252 nM wies das Molekül 13-15\_C auf. Auch die auf die G-reiche Region verkürzte zweite Variante 13-15\_D1, welche lediglich aus 18 Nukleotiden bestand, konnte das Protein mit ähnlicher Affinität ( $K_d \approx 418$  nM) binden. Allerdings zeigte die erste auf den G-reichen Bereich verkürzte DNA-Variante 13-15\_D (19 nt) eine stark reduzierte Bindungsaffinität

#### 4. Ergebnisse

(~ 1639 nM) zum Zielmolekül. Eine ebenfalls reduzierte Affinität wies die Variante 13-15\_B (~ 1310 nM) auf. Da der Sättigungsbereich der DNA-Protein-Interaktion bei einer maximalen Hyper-IL-6 Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nicht vollständig erreicht werden konnte, sollten die angegebenen Werte für die Aptamervarianten 13-15\_B, 13\_15\_D und 13-15\_D1 als Richtwerte gesehen werden. Die Auswertung dieser Filterbindungsstudien ist in Abbildung 4.16 graphisch zusammengefasst.



**Abb. 4.16: Bindung der verkürzten DNA-Varianten des Aptamers 13-15.** Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Anteile an gebundenem DNA-Aptamer in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen. (logarithmische Auftragung; Daten aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten).

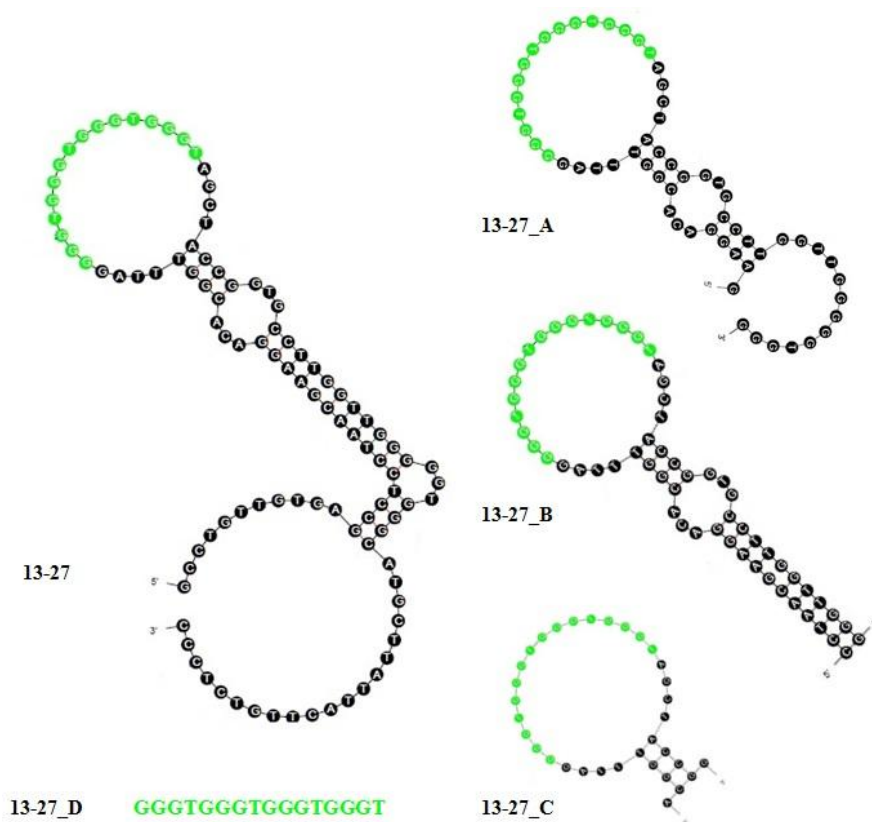
Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, zeigten alle verkürzten DNA-Aptamere eine Bindung an das Protein Hyper-IL-6. Die Affinität des um 83 Nukleotide verkürzten Aptamers 13-15\_D1 lag in etwa im Bereich des ursprünglichen *full length* Aptamers 13-15. Aus diesem Grund wurde diese Variante für weitere Experimente zur Charakterisierung der Interaktion von Aptamer und Hyper-IL-6 gewählt.

**Tab. 4.3: Anteil maximaler Bindung und  $K_d$ -Werte der verkürzten Varianten des Aptamers 13-15 an Hyper-IL-6.** Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in mehreren gezeigten Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells ermittelt.

Aptamer	Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]	Anzahl der Experimente
13-15_A	35,5 ± 4	343 ± 90	4
13-15_B	60,9 ± 21	1310 ± 704	4
13-15_C	26,7 ± 4	252 ± 81	4
13-15_D	55,3 ± 58	1639 ± 2486	3
13-15_D1	93,7 ± 23	418 ± 226	8

#### 4. Ergebnisse

Analog zum Aptamer 13-15 wurde das Aptamer 13-27 ebenfalls in mehreren Schritten verkürzt. Dabei wurde auch hier darauf geachtet, dass alle Verkürzungen mindestens die Konsensussequenz beinhalteten. Zunächst wurde auf die Primerregion verzichtet und das Aptamer somit auf eine Länge von 60 Nukleotiden verkürzt (13-27\_A). Ausgehend von der Sekundärstruktur-Vorhersage (Abb. 4.17) wurde die G-reiche Region der Variante 13-27\_B um den gesamten, überwiegend doppelsträngigen Bereich verlängert (60 nt). Die dritte verkürzte DNA 13-27\_C (34 nt) beinhaltete zusätzlich zur G-reichen Region den doppelsträngigen Bereich bestehend aus 4 Basenpaaren. Als vierte und letzte Variante wurde das Aptamer bis auf die 16 Nukleotide lange Konsensussequenz verkürzt (13-27\_D).

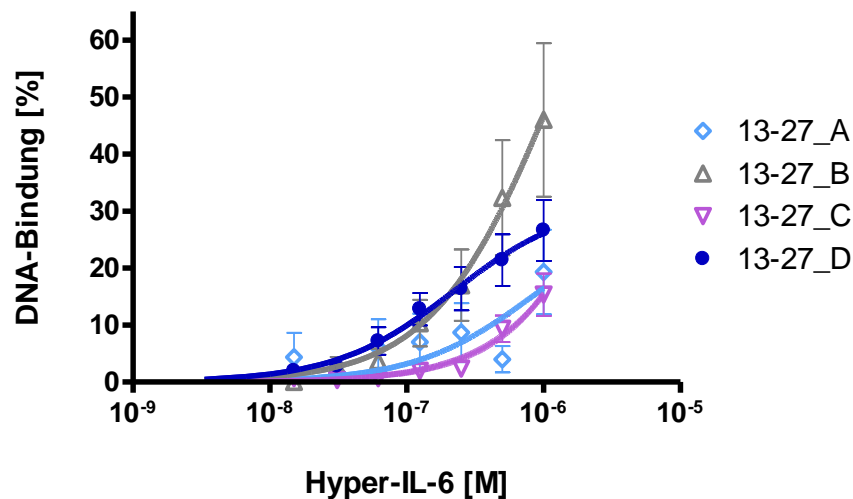


Aptamer [nt]	Sequenz
13-27_A [60]	GAAGGACACGGTTTAG <b>GGGTGGGTGGGTGGGT</b> AGCTACCGGTGCCTTGGTTGGGGGTGGG
13-27_B [60]	CCTAACGAAGGACACGGTTTAG <b>GGGTGGGTGGGTGGGT</b> AGCTACCGGTGCCAAGGTGGG
13-27_C [34]	ACGGTTAG <b>GGGTGGGTGGGTGGGT</b> AGCTACCGG
13-27_D [16]	<b>GGGTGGGTGGGTGGGT</b>

**Abb. 4.17: Verkürzungen des Aptamers 13-27 anhand von Sekundärstruktur-Vorhersagen mittels *mfold web server* [110]. Oben:** full length Aptamer 13-27 und die jeweiligen vorhergesagten Sekundärstrukturen der verkürzten Varianten 13-27\_A, 13-27\_B, 13-27\_C, sowie die Sequenz der G-reichen Region, 13-27\_D. Konservierte Basen der G-reichen Region, die in allen Verkürzungen erhalten blieb, sind grün hervorgehoben. **Unten:** DNA-Sequenzen der verkürzten Aptamer-Varianten in 5'-3'-Richtung.

#### 4. Ergebnisse

Zur Analyse der Bindungseigenschaften der verkürzten DNA-Varianten wurden Filterbindungsstudien durchgeführt (Abb. 4.18). Dabei konnte festgestellt werden, dass drei der getesteten DNA-Moleküle (13-27\_A, 13-27\_B und 13-27\_C) eine sehr stark reduzierte Bindungsaffinität zum Rezeptor (Tab. 4.4) im Vergleich zu 13-27 aufwiesen. Hierbei muss erwähnt werden, dass für diese Aptamere die ermittelten Dissoziationskonstanten nur als Richtwerte gesehen werden sollten, da der Sättigungsbereich der DNA-Protein-Interaktion nicht erreicht werden konnte. Lediglich das kürzeste, auf die G-reiche Region reduzierte Aptamer 13-27\_D (16 nt) zeigte eine dem ursprünglichen Aptamer ähnliche Affinität zum Zielmolekül ( $K_d \approx 221$  nM). In Abbildung 4.18 ist die Auswertung der Filterbindungsstudien zusammengefasst und graphisch dargestellt.



**Abb. 4.18: Bindung der verkürzten DNA-Varianten des Aptamers 13-27.** In Filterbindungsstudien ermittelter prozentualer Anteil an gebundener DNA in Abhängigkeit von der sIL-6R-Konzentration (logarithmische Auftragung; Daten aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Filterbindungsstudien wurde zusätzlich die kurze Variante 13-27\_D für weitere Experimente zur Untersuchung und Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Aptamer und Protein gewählt.



## 4. Ergebnisse

**Tab. 4.4: Anteil maximaler Bindung und  $K_d$ -Werte der verkürzten Varianten des Aptamers 13-27 an Hyper-IL-6.** Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in mehreren gezeigten Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells ermittelt.

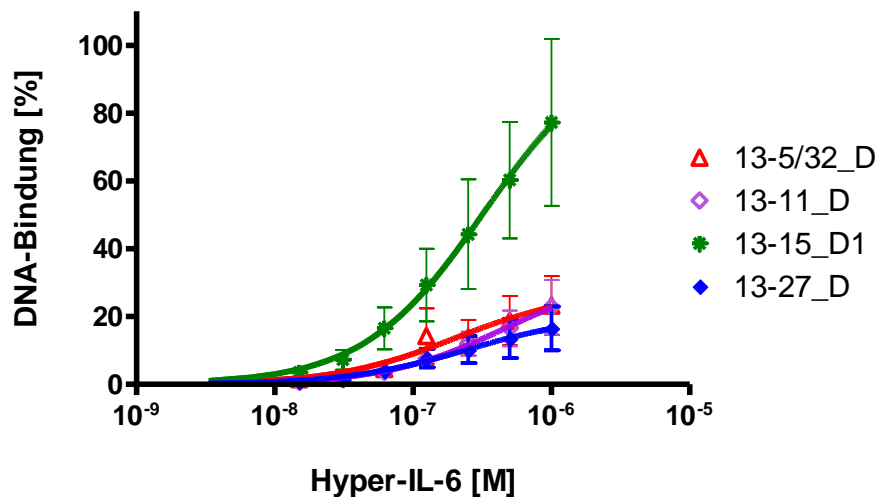
Aptamer	Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]	Anzahl der Experimente
13-27_A	$30,4 \pm 27$	$848 \pm 1318$	3
13-27_B	$98 \pm 49,5$	$1100 \pm 898$	3
13-27_C	$100 \pm 187$	$5553 \pm 11914$	3
13-27_D	$32 \pm 5$	$221 \pm 91,5$	5

### 4.5.2. Bindungsstudien aller fünf G-reichen Varianten der selektierten Aptamere (D-Varianten)

Fünf der für den sIL-6R selektierten DNA-Aptamere (13-5, 13-11, 13-15, 13-27 und 13-32) wiesen ein gemeinsames, charakteristisches Konsensusmotiv, aus sich mehrfach wiederholenden Guanin-Abfolgen auf (5'-GGGT<sub>1-3</sub>GGGYGGGTGGGW-3'). Diese wurden hauptsächlich durch Thymin unterbrochen (Schleife oder Loop). Die Aptamere unterschieden sich lediglich in der Länge bzw. der Sequenz dieser Loops (Unterbrechungen). Dabei war der erste Loop mit einer Thyminbase für das Aptamer 13-27\_D, mit zwei Thyminresten für das Aptamer 13-11 bzw. mit drei Thyminen im ersten Loop für das Aptamer 13-15\_D1 charakteristisch. Im zweiten Loop wurde statt des Thymins jeweils ein Cytosin für die Aptamere 13-5 und 13-32 gefunden. Der dritte Loop war für alle Aptamere konserviert und durch ein Thymin besetzt. Aptamer 13-11 beinhaltete zusätzlich am 3'-Ende ein Adeninrest, anstatt eines Thymins, die bei den anderen vier Aptameren konserviert war. Da ein endständiges Thymin am häufigsten vertreten war, wurde ein modifiziertes 13-11 Aptamer mit 3'-endständigem Thymin für die Bindungsstudie verwendet. Die bis auf die Konsensussequenz verkürzten Varianten der Aptamere 13-15 und 13-27 sind durch Addition des Buchstaben D gekennzeichnet worden (13-15\_D1 bzw. 13-27\_D). Diese Bezeichnung wurde auch für die weiteren drei Aptamere übernommen. Da sich die Aptamere 13-5 und 13-32 in der Konsensussequenz nicht unterschieden, wurde lediglich eine Nukleinsäure mit dem Namen 13-5/32\_D verwendet.

Untersucht werden sollte, ob sich die Affinität zum Rezeptor durch die unterschiedlichen Loops im Bindemotiv ändert.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.19: Bindung der auf die G-reiche Region verkürzten D-Varianten der Aptamere 13-5/32, 13-11, 13-15 und 13-27 an Hyper-IL-6.** Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Anteile an gebundenem DNA-Aptamer in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen. (logarithmische Auftragung; Daten aus vier voneinander unabhängigen Experimenten).

Die Bindung der kurzen D-Aptamere an das Zielmolekül Hyper-IL-6 wurde anhand von Filterbindungsstudien untersucht (3.6.1) und deren Affinität zum Zielprotein determiniert. Wie in Abbildung 4.19 ersichtlich wird, konnten alle getesteten kurzen Aptamer-Varianten das Zielmolekül (Hyper-IL-6) binden und wiesen sehr ähnliche Bindungseigenschaften auf. Die ermittelten Dissoziationskonstanten lagen in etwa im Bereich einer Größenordnung zwischen 200 nM und 500 nM und sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

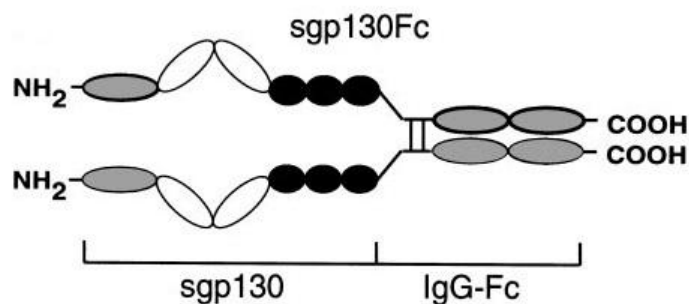
**Tab. 4.5: Anteil maximaler Bindung und  $K_d$ -Werte der verkürzten D-Varianten der Aptamere 13-5/32, 13-11, 13-15 und 13-27 an Hyper-IL-6.** Die Daten wurden in vier unabhängigen Filterbindungsstudien unter Verwendung des *One-Site-Binding*-Modells ermittelt. Die in den Loops variierenden Nukleotide sind rot hervorgehoben.

Aptamer [nt]	Sequenz	Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]
13-5/32_D [16]	GGGT--GGG <b>C</b> GGGTGGGT	27,4 ± 7,7	204 ± 158
13-11_D [17]	GGGT <b>T</b> -GGGTGGGTGGGT	32,9 ± 10,4	458 ± 308
13-15_D1 [18]	GGGT <b>TT</b> GGGTGGGTGGGT	100 ± 25,6	316 ± 194
13-27_D [16]	GGGT--GGGTGGGTGGGT	20,4 ± 5,8	244 ± 180

## 4. Ergebnisse

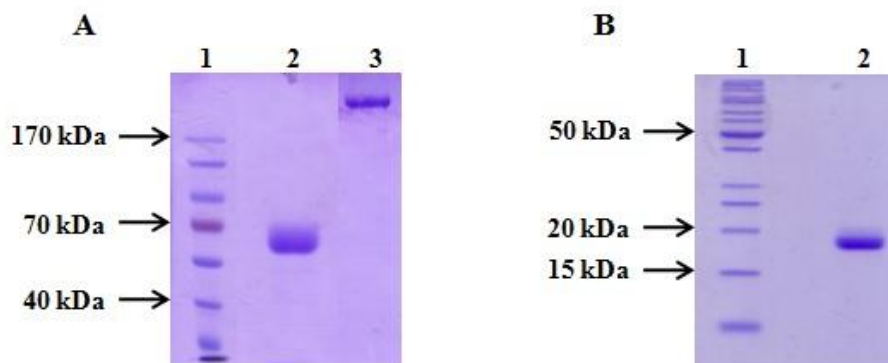
### 4.6. Kompetitionsstudien

In *in vitro* Kompetitionsstudien sollte die Wechselwirkung zwischen den selektierten DNA-Aptameren und Hyper-IL-6 in An- und Abwesenheit der natürlichen Liganden (IL-6 und gp130) sowie anderer Nukleinsäuren untersucht werden. Der Komplex aus IL-6 und IL-6R bindet und aktiviert ein Homodimer aus der Rezeptoruntereinheit gp130. Neben dem löslichen IL-6R existiert auch eine lösliche Form des gp130 (sgp130), die durch alternatives Spleißen entsteht [123]. Durch genetische Fusion von sgp130 mit dem konstanten Teil (Fc) eines IgG1-Antikörpers wurde eine aktivere Proteinvariante, das sgp130Fc geschaffen (Abb. 4.20, [19, 123]). Die Fc-vermittelte Dimerisierung ist dabei höchstwahrscheinlich der Grund der Aktivitätssteigerung. In Abbildung 4.20 ist dieses Fusionsprotein schematisch dargestellt.



**Abb. 4.20: Das Fusionsprotein sgp130Fc [123].** Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des gp130 (schwarz: Fibronektin (FN) Typ III-ähnliche Domäne, weiß: zytokinbindende Domänen, grau: Ig-ähnliche Domäne) und der Fc-Region eines humanen IgG-Antikörpers. Die Dimerisierung wird durch den Fc-Teil vermittelt.

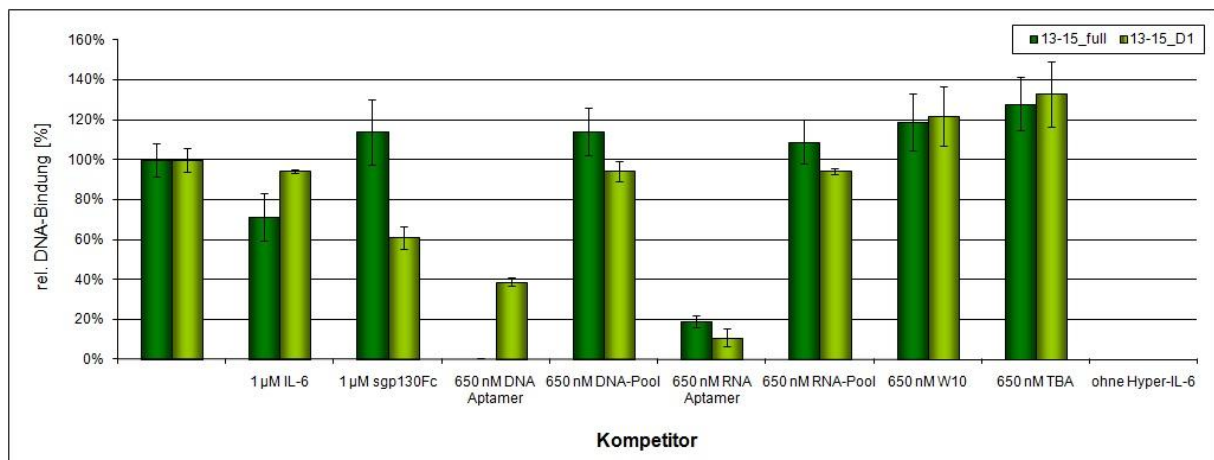
Vor der Durchführung der Kompetitionsstudien wurden alle drei Proteine, das Hyper-IL-6, sgp130Fc und IL-6 mittels SDS-PAGE (3.1.1) kontrolliert (Abb. 4.21). Alle Proteine zeigten eine bei entsprechendem Molekulargewicht charakteristische Bande.



**Abb. 4.21: SDS-PAGE-Gele zur Analyse der Proteine Hyper-IL-6, sgp130Fc und IL-6.** Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. **A)** 7,5%-iges SDS-PAGE-Gel. Spur 1: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*; Spur 2: 2,85 µg Hyper IL-6 (~ 57 kDa); Spur 3: 2,2 µg sgp130Fc-Dimer (~ 189 kDa). **B)** 15%iges SDS-PAGE-Gel. Spur 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*; Spur 2: 2,75 µg IL-6 (~ 21 kDa).

## 4. Ergebnisse

In Filterbindungsstudien wurde die radioaktiv markierte ssDNA ( $< 0,5$  nM) mit dem jeweils zu testenden Kompetitor gemischt, anschließend zu 500 nM Hyper-IL-6 pipettiert, inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert (3.6.1). Die Auswertung erfolgte autoradiographisch (3.1.5). Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für die Wettbewerbsstudien der Aptamere 13-15 und 13-15\_D1. Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das selektierte Aptamer und das Interleukin-6 nicht um dieselbe Bindestelle am Rezeptor konkurrieren. Anhand dieser Studie konnte das Ergebnis bestätigt werden.



**Abb. 4.22: Bindungsstudie der DNA-Aptamere 13-15 und 13-15\_D1 an Hyper-IL-6 in An- und Abwesenheit möglicher Kompetitoren.** Der Anteil relativer DNA-Bindung (in %) wurde bei einer definierten Konzentration an Hyper-IL-6 (500 nM) in An- und Abwesenheit verschiedener Liganden in Filterbindungsstudien ermittelt. Die gezeigten Messpunkte und Standardabweichungen ergaben sich aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Studien. Erläuterungen siehe Text.

Im Vergleich zur relativen Bindung der Aptamere an Hyper-IL-6 in Abwesenheit jeglicher Liganden (Abb. 4.22, Balken 1), wurde der Einfluss zugefügter Kompetitoren auf die Interaktion zwischen Aptamer und Hyper-IL-6 determiniert. In Anwesenheit von 1 µM IL-6 wurde die Bindung des *full length* Aptamers 13-15 um etwa 30% reduziert. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss auf die Bindung des 13-15\_D1 an Hyper-IL-6 beobachtet werden. Durch Zugabe von 1 µM sgp130Fc als Kompetitor wurde lediglich die kurze Aptamer-Variante um ca. 40% in der Bindung reduziert. Dies implizierte, dass das Aptamer ebenfalls an einer von gp130 unabhängigen Region mit dem Hyper-IL-6 interagiert. Gab man unmarkierte Aptamer-DNA im Überschuss dazu, wurden die markierten Aptamere vollständig (13-15) bzw. um etwa 60% (13-15\_D1) verdrängt. Keinen Einfluss auf die Interaktion der Aptamere mit dem Zielmolekül zeigte der Einsatz von unselektierter DNA- (Balken 5, 650 nM DNA-Pool) bzw. eine RNA-Bibliothek (Balken 7, 650 nM RNA-Pool). Ebenfalls konnte bei Verwendung einer definierten ssDNA W10 (120 nt, Balken 8, 650 nM

## 4. Ergebnisse

W10), die einer Aptamerselektion für p53 der Arbeitsgruppe Hahn entstammte (unveröffentlichte Daten) kein Effekt beobachtet werden. Als weiterer Kompetitor wurde ein 15 nt-kurzes Thrombin-bindendes Aptamer (TBA, 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), welches einen G-Quadruplex formiert [39] ausgewählt. Doch auch diese Nukleinsäure kompetierte nicht mit den sIL-6R-bindenden DNA-Aptameren. Eine Kompetition konnte lediglich bei Zugabe eines sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamers (16-3) beobachtet werden, welches in der Arbeitsgruppe Hahn, während der Promotionsarbeit von Frau Meyer selektiert wurde [13]. Dabei wurde die Bindung der DNA-Aptamere auf etwa 20% (13-15) bzw. ca. 10% (13-15\_D1) reduziert.

### 4.7. Charakterisierung der verkürzten Aptamere

#### 4.7.1. Einfluss von Mutationen in den G-Tripletts

Das gehäufte Vorkommen von Guaninresten in der Konsensussequenz (Abb. 4.7) führte zu der Annahme, dass die Aptamere stabile Q-Quadruplexe ausbilden könnten. Aus der Literatur war bekannt, dass ein HIV-1-Integrase Inhibitor mit derselben Sequenz wie das selektierte verkürzte Aptamer 13-27\_D eine solche Konformation mit drei G-Quartetten ausbildet [61]. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine Punktmutante (13-27\_D-G6T, Abb. 4.23) erstellt, wobei die mittlere Guaninbase des zweiten G-Tripletts durch ein T ersetzt wurde. Die Mutation eines an der Quadruplex-Formation beteiligten G-Tripletts sollte zum Verlust der Bindung führen [124]. In einer Filterbindungsstudie (3.6.1) wurde die Affinität des Aptamers 13-27\_D und die der Mutante 13-27\_D-G6T zum Hyper IL-6 untersucht (Abb. 4.23).

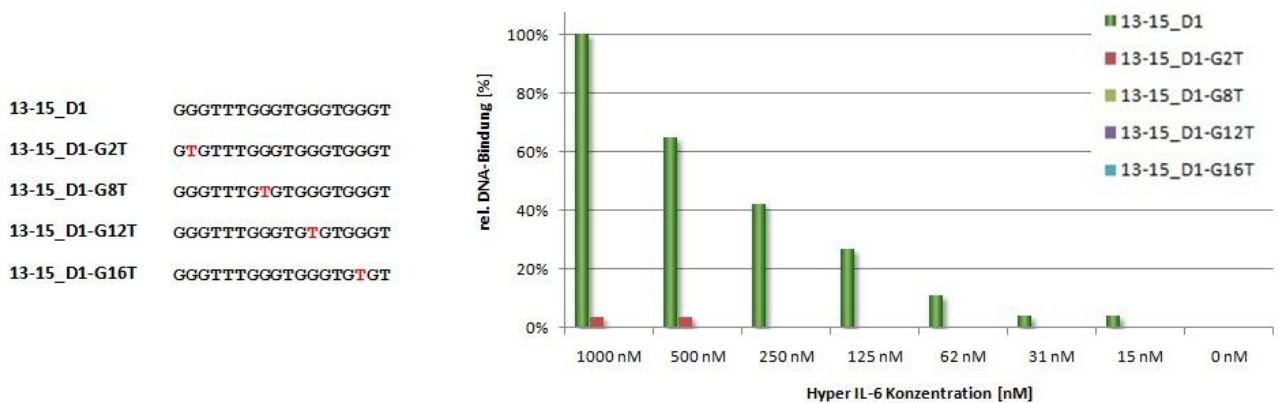


**Abb. 4.23: Auswirkung von Mutationen in den G-Tripletts auf die Aptamerbindung an Hyper-IL-6 .** **Links:** Sequenzen des Aptamers 13-27\_D und der Mutante 13-27\_D-G6T dargestellt in 5'-3'-Richtung. Die bei der Mutante durch Thymin ersetzte Guaninbase ist rot hervorgehoben. **Rechts:** In der Filterbindungsstudie wurde die jeweilige, radioaktiv markierte ssDNA (< 0,5 nM) in steigenden Konzentrationen (0 nM – 1 µM) mit dem Hyper IL-6 inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Dargestellt sind die mittels Autoradiographie detektierten auf der Membran verbliebenen Mengen markierter ssDNA.

Die erhöhte Intensität der Dots bei steigenden Proteinkonzentrationen, wies erneut auf eine konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers 13-27\_D an Hyper-IL-6 hin (Abb. 4.23). Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung der Mutante an Hyper-IL-6 detektiert werden.

## 4. Ergebnisse

Unter der Annahme, dass das Aptamer 13-15\_D1 ebenfalls ein G-Quadruplex ausbilden kann, wurde das gleiche Experiment für dieses Aptamer durchgeführt. Zur Verifizierung dieser Vermutung wurden vier verschiedene Punktmutanten verwendet, denen nacheinander jeweils die mittlere Guaninbase im G-Triplett durch ein Thymin ersetzt wurde (Abb. 4.24). Die Auswertung der Filterbindungsstudie ist in Abbildung 4.24 graphisch dargestellt. Der Austausch jeweils einer definierten Guaninbase in den G-Triplets gegen Thymin führte zu einem Verlust der Affinität für Hyper-IL-6. Lediglich das Aptamer 13-15\_D1 war in der Lage, mit dem Protein zu interagieren.



**Abb. 4.24: Auswirkung von Mutationen in den G-Triplets vier ausgewählter Mutanten auf die Bindung an Hyper-IL-6.** Links: Sequenzen des Aptamers 13-15\_D1 und der Mutanten dargestellt in 5'-3'-Richtung. Die bei den Mutanten durch Thymin ersetzte Guaninbase ist rot hervorgehoben. Rechts: In der Filterbindungsstudie wurde die jeweilige, radioaktiv markierte ssDNA (< 0,5 nM) in steigenden Konzentrationen (0 nM – 1  $\mu$ M) mit dem Hyper-IL-6 inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Dargestellt ist der Anteil relativer DNA-Bindung (in %) bei definierten Hyper-IL-6 Konzentrationen.

### 4.7.2. T am 5'- und/oder 3'-Ende des Aptamers 13-27\_D

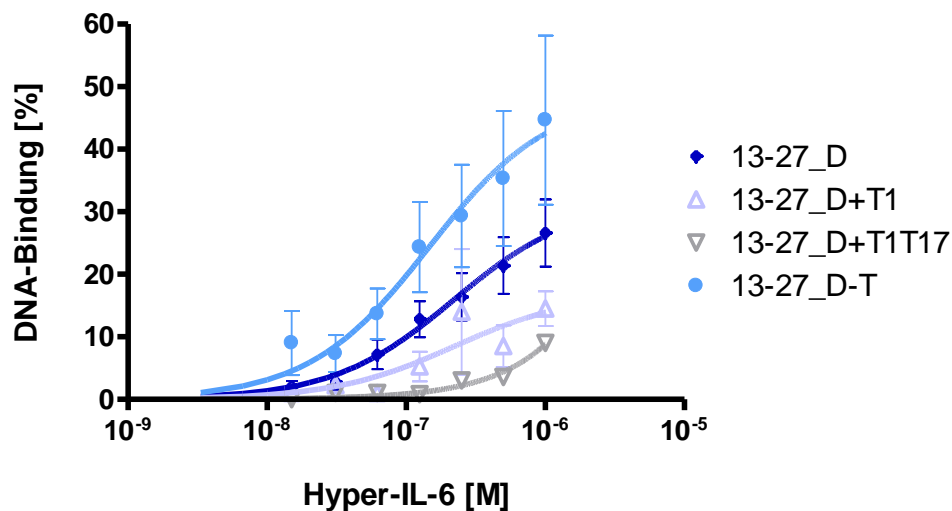
Um die Auswirkung endständiger Thyminereste auf die Formation des Quadruplex und somit auf die Bindung an das Zielmolekül den sIL-6R zu studieren, wurden drei verschiedene Aptamer-Varianten verwendet. Ausgehend vom Aptamer 13-27\_D, dessen Guanin-Abfolgen jeweils durch einen T-Loop unterbrochen sind (5'-GGGTGGGTGGGTGGGT-3'), wurde als erste Variante eine Nukleinsäure generiert, bei der am 5'-Ende ein T hinzugefügt, dafür aber das 3'-endständige T entfernt wurde (13-27\_D+T1). Die zweite Variante beinhaltet an beiden Enden jeweils ein T (13-27\_D+T1T17). Die dritte war durch das Fehlen der Ts an beiden Enden der Sequenz charakterisiert (13-27\_D-T). In Tabelle 4.6 sind alle Varianten und die jeweiligen Sequenzen zusammengefasst.

#### 4. Ergebnisse

**Tab. 4.6: Sequenzen der T-Varianten des 13-27\_D Aptamers.** Die jeweilige Veränderung der Variante, ausgehend von dem DNA-Aptamer 13-27\_D ist rot hervorgehoben oder durch Striche (-) gekennzeichnet.

Aptamer [nt]		Sequenz in 5'-3'-Richtung
13-27_D	[16]	GGGTGGGTGGGTGGGT
13-27_D+T1	[16]	<b>T</b> GGGTGGGTGGGTGGG-
13-27_D+T1T17	[17]	<b>T</b> GGGTGGGTGGGTGGG <b>T</b>
13-27_D-T	[15]	-GGGTGGGTGGGTGGG-

Die Bindungseigenschaften dieser Varianten im Vergleich zum Aptamer 13-27\_D wurden in Filterbindungsstudien (3.6.1) untersucht und sind in Abbildung 4.25 graphisch dargestellt.



**Abb. 4.25: Bindung der T-Varianten des Aptamers 13-27\_D an Hyper-IL-6.** Die in Filterbindungsstudien ermittelten prozentualen Anteile an gebundener DNA sind in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen dargestellt (logarithmische Auftragung). Daten aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Wie der Abbildung 4.25 zu entnehmen ist, zeigte die Variante 13-27\_D+T1T17 mit den die Konsensussequenz flankierenden Ts eine stark reduzierte Affinität zum Zielmolekül ( $K_d \approx 10 \mu\text{M}$ , Tab. 4.7). Die Änderung der Position des endständigen T bzw. das Fehlen der T an beiden Enden hatten keinen Einfluss auf die Aptamerbindung. Beide Aptamer-Varianten sowohl 13-25\_D+T1 als auch 13-27\_D-T zeigten eine dem Aptamer 13-27\_D ( $K_d \approx 221 \text{ nM}$ ) ähnliche Affinität zum Hyper-IL-6 ( $K_d \approx 363 \text{ nM}$  bzw.  $K_d \approx 146 \text{ nM}$ ).

## 4. Ergebnisse

**Tab. 4.7: Anteil maximaler DNA-Bindung und  $K_d$ -Werte der endständigen T-Varianten des Aptamers 13-27\_D an Hyper-IL-6.** Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells ermittelt.

Aptamer [nt]		Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]	Anzahl der Experimente
13-27_D	[16]	$31,9 \pm 5$	$221 \pm 91,5$	5
13-27_D+T1	[16]	$31,1 \pm 12,1$	$363 \pm 326$	5
13-27_D+T1T17	[17]	100	10484	5
13-27_D-T	[15]	$48,7 \pm 8,7$	$146 \pm 78,6$	3

### 4.7.3. Loop-Varianten des Aptamers 13-27\_D

Die Länge und Sequenz der Loops spielen bei der Art der Formation sowie der Stabilität von G-Quadruplexen eine wichtige Rolle [69]. Außerdem liegen die meisten Protein-Quadruplex-Wechselwirkungen in den Loops [57]. Folgend sollte der Einfluss von Loop-Varianten auf die Aptamerbindung untersucht werden. Hierfür wurden drei Nukleinsäuren verwendet, bei denen jeweils die Thyminbase des ersten Loops (13-27\_D-T4A), des zweiten (13-27\_D-T8A) bzw. des dritten Loops (13-27\_D-T12A) durch ein Adenin ersetzt wurde (Abb. 4.8). Eine vierte Variante war durch den Austausch des 3'-endständigen Thymins durch ein Adenin charakterisiert. Bei der letzten Loop-Variante 13-27\_D+A sind alle Thymine durch Adenine ersetzt.

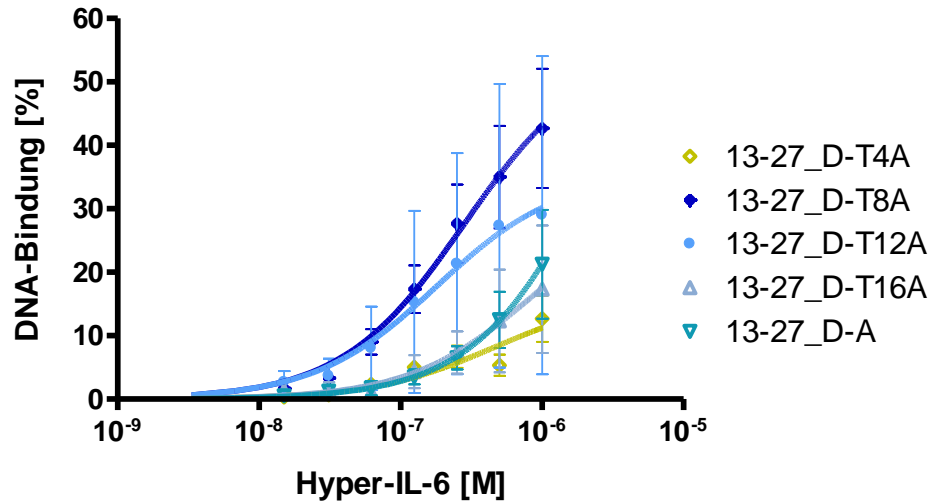
**Tab. 4.8: Sequenzen der Loop-Varianten des Aptamers 13-27\_D.** Die jeweilige Änderung innerhalb der Sequenz einer Variante, ausgehend von dem DNA-Aptamer 13-27\_D ist rot hervorgehoben.

Aptamer [nt]		Sequenz in 5'-3'-Richtung
13-27_D-T4A	[16]	GGGA <sub>4</sub> GGGTGGGTGGGT
13-27_D-T8A	[16]	GGGTGGGA <sub>8</sub> GGGTGGGT
13-27_D-T12A	[16]	GGGTGGGTGGGA <sub>12</sub> GGGT
13-27_D-T16A	[16]	GGGTGGGTGGGTGGGA <sub>16</sub>
13-27_D+A	[16]	GGGAGGGAGGGAGGGA

In Filterbindungsstudien (3.6.1) sollte die Auswirkung dieser Basenaustausche in den Loops auf die Aptamerbindung an Hyper-IL-6 untersucht werden. Die Auswertung dieser Experimente ist in Abbildung 4.26 graphisch dargestellt.



#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.26: Bindung der Loop-Varianten des Aptamers 13-27\_D an Hyper-IL-6.** Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Anteile an gebundenem DNA-Aptamer in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen. (logarithmische Auftragung; Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten).

Die Loop-Varianten 13-27\_D-T8A und 13-27\_D-T12A zeigten zum Aptamer 13-27\_D vergleichbare Bindungseigenschaften für das Protein Hyper-IL-6. So konnten für diese Aptamer-Varianten  $K_d$ -Werte von  $283 \pm 115$  nM (13-27\_D-T8A) bzw.  $181 \pm 264$  nM (13-27\_D-T12A) ermittelt werden (Tab. 4.8). Der Austausch des T an Position 4 im ersten Loop (13-27\_D-T4A) schwächte dagegen die Bindung zum Zielprotein etwas ab ( $K_d \approx 471 \pm 306$  nM). Die Substitution des 3'-endständigen Thymins der Loop-Variante 13-27\_D-T16A führte zu einer deutlich reduzierten Affinität zum Zielmolekül ( $K_d \approx 844 \pm 1171$  nM). Wurden alle Thyminbasen des Aptamers 13-27\_D gegen Adenine ausgetauscht (13-27\_D+A), konnte ein starker Funktionsverlust verzeichnet werden mit einer Dissoziationskonstante von  $2604 \pm 4527$  nM. Es soll hier drauf hingewiesen werden, dass zur Bestimmung genauer  $K_d$ -Werte für die Loop-Varianten 13-27\_D-T4A, 13-27\_D-T16A und 13-27\_D+A weitere Messpunkte bei höheren Proteinkonzentrationen notwendig gewesen wären, um in den Sättigungsbereich zu gelangen.

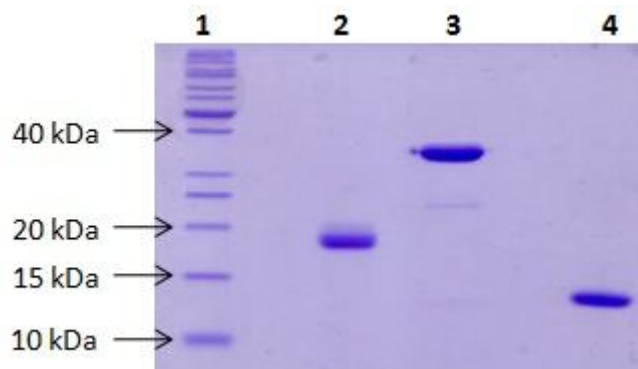
## 4. Ergebnisse

**Tab. 4.9: Anteil maximaler Bindung und  $K_d$ -Werte der Loop-Varianten an Hyper IL-6.** Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in mehreren unabhängigen Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells ermittelt.

Aptamer [nt]	Anteil maximaler Bindung [%]	$K_d$ [nM]	Anzahl der Experimente
13-27_D-T4A [16]	$16,5 \pm 5$	$471 \pm 306$	3
13-27_D-T8A [16]	$55,3 \pm 9$	$283 \pm 115$	3
13-27_D-T12A [16]	$35,7 \pm 18,3$	$181 \pm 264$	3
13-27_D-T16A [16]	$32,2 \pm 25,5$	$844 \pm 1171$	3
13-27_D+A [16]	$76,6 \pm 103$	$2604 \pm 4527$	4

### 4.7.4. Spezifität des kurzen Aptamers 13-27\_D-T

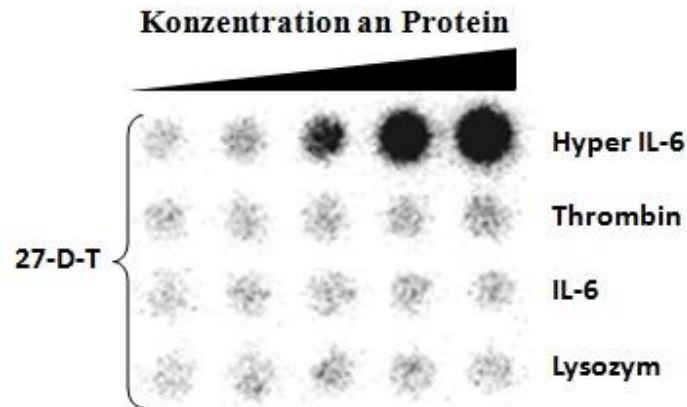
In Filterbindungsstudien sollte gezeigt werden, dass die Interaktion der selektierten und verkürzten DNA-Aptamere spezifisch für das Zielmolekül Hyper-IL-6 ist. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich drei Kontrollproteine eingesetzt. Es handelte sich dabei einerseits um den natürlichen Liganden des IL-6R das Interleukin-6 (IL-6) und andererseits um Lysozym, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Protein, welches die in den Zellwänden von Prokaryoten vorkommenden Polysaccharide spalten kann. Das dritte Kontrollprotein war Thrombin, ein an der Blutgerinnung beteiligtes Enzym. Vor Durchführung der Studien wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (3.1.1) kontrolliert (Abb. 4.27).



**Abb. 4.27: 15%-iges SDS-PAA-Gel zur Kontrolle der Proteine IL-6, Thrombin und Lysozym.** Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt. Spur 1: *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*; Spur 2: 2,75 µg IL-6 (~ 21 kDa), Spur 3: 2,4 µg Thrombin (~ 37 kDa), Spur 4: 2,5 µg Lysozym (~ 14,4 kDa).

Alle drei Proteine zeigten eine charakteristische Bande bei jeweils entsprechendem Molekulargewicht (Abb. 4.27). So konnten diese neben dem Hyper-IL-6 als Positivkontrolle zur Untersuchung der Spezifität des Aptamers 13-27\_D-T verwendet werden (Abb. 4.28).

## 4. Ergebnisse



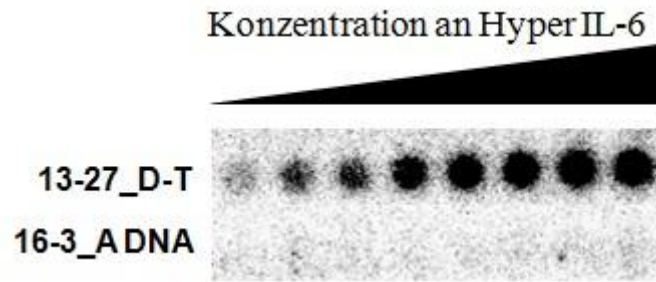
**Abb. 4.28: Analyse der spezifischen Interaktion zwischen dem Aptamer 13-27\_D-T und dem Zielmolekül Hyper-IL-6 unter Verwendung dreier Kontrollproteine.** In der Filterbindungsstudie wurde das radioaktiv markierte DNA-Aptamer 13-27\_D-T (< 0,5 nM) in steigenden Konzentrationen (0 nM – 1000 nM) mit den jeweiligen Kontrollproteinen IL-6, Thrombin und Lysozym inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit Hyper-IL-6. Dargestellt sind die mittels Autoradiographie detektierten auf der Membran verbliebenen Mengen radioaktiv markierter ssDNA. Es handelte sich hierbei um eine Einfachbestimmung.

Wie anhand Abbildung 4.28 ersichtlich wird, konnte keine Wechselwirkung zwischen dem Aptamer 13-27\_D-T und den getesteten drei Kontrollproteinen beobachtet werden. Hyper-IL-6 als Positivkontrolle hingegen zeigte eine starke Interaktion mit dem Aptamer. Dieses Experiment wurde ebenfalls für die Aptamere 13-15\_D1 und 13-27\_D durchgeführt. Aufgrund ähnlicher Ergebnisse wurden diese Daten hier nicht zusätzlich dargestellt.

### 4.7.5. IL-6R-spezifisches RNA-Aptamer als DNA-Variante

Aus den ersten Bindungsstudien ging hervor, dass nur DNA-Aptamere mit einer G-reichen Konsensussequenz in der Lage waren den Rezeptor zu binden (Abb. 4.8). Es stellte sich die Frage, ob ein IL-6R-spezifisches, G-reiches RNA-Aptamer, welches während der Promotionsarbeit von Frau Dr. Meyer selektiert wurde [13], als sequenzidentisches DNA-Molekül weiterhin befähigt war mit dem Zielmolekül zu interagieren. Hierfür wurde das 19 Nukleotide-kurze RNA-Aptamer 16-3\_A ( $K_d$ -Wert  $\approx$  446 nM) mit dem G-reichen Bindemotiv 5'-GGGGAGGCUGUGGUGAGGG-3' gewählt. Anders als für das Dopamin Aptamer beschrieben [125], konnte keine Beibehaltung der Funktion für das sequenzidentische DNA-Molekül des IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers in Filterbindungsstudien beobachtet werden (Abb. 4.29).

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.29: Analyse der Interaktion eines IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers 16-3\_A als DNA-Variante mit Hyper-IL-6.** In einer Filterbindungsstudie wurde die Interaktion eines IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers als DNA-Variante mit Hyper-IL-6 untersucht. Dabei wurden die radioaktiv markierten ssDNA-Moleküle mit steigenden Konzentrationen (0 – 1  $\mu$ M) an Hyper-IL-6 inkubiert. Die nach der Filtration der Reaktionsansätze über eine Nitrozellulosemembran verbliebene Menge an radioaktiv markierter ssDNA wurde mittels Autoradiographie detektiert.

### 4.7.6. Einfluss der Anzahl an postulierten G-Tetraden auf die Aptamerbindung

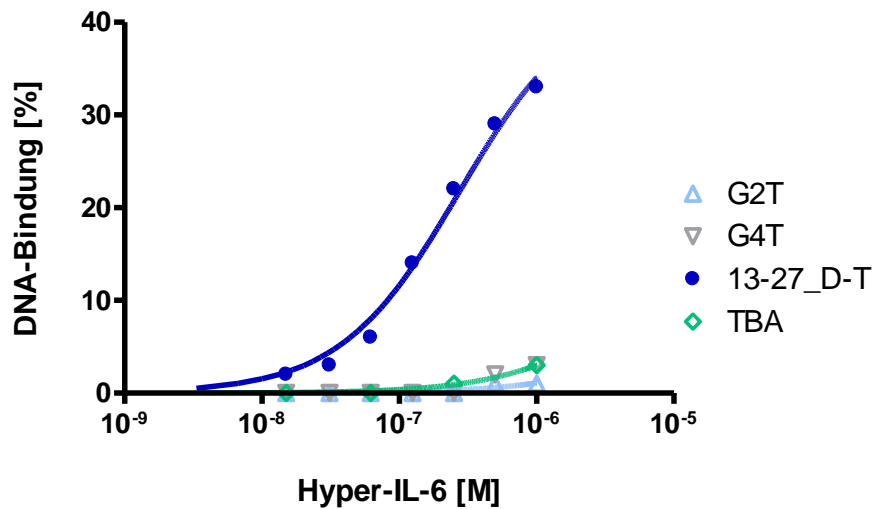
Aus der Literatur war bekannt, dass die selektierten und verkürzten DNA-Aptamere 13-27\_D und 13-27\_D-T intramolekulare G-Quadruplexe mit drei übereinander gestapelten G-Quartetten ausbilden sollten [61, 66]. Folgend sollte der Einfluss der Anzahl an G-Tetraden auf die Aptamerbindung in Filterbindungsstudien untersucht werden. Hierfür wurden DNA-Aptamere verwendet, die sich in der Anzahl der G-Quartett-Stapel unterschieden. Ausgehend von der Konsensussequenz des Aptamers 13-27\_D-T wurden die an der Formation der G-Quadruplexe beteiligten G-Triplets jeweils um ein G verkürzt ( $G_2T$ ) bzw. um jeweils ein G erweitert ( $G_4T$ ) (Tab. 4.10). Es wurde angenommen, dass durch die Reduktion eines Gs im  $G_2T$ -Molekül, lediglich ein G-Quadruplex mit zwei G-Quartetten bzw. durch die Addition der Guanine ( $G_4T$ ) ein G-Quadruplex mit vier planar angeordneten G-Quartetten ausgebildet werden konnte. Für diese Analyse wurde zusätzlich das 15 nt-kurze Thrombin-bindende DNA-Aptamer (TBA) verwendet, von dem bekannt war ein G-Quadruplex mit zwei übereinander gestapelten G-Quartetten auszubilden [59], verwendet.

**Tab. 4.10: Sequenzen möglicher G-Quadruplexe ausbildender Aptamere.** Die Formation sogenannter G-Quadruplexe ist für das Aptamer 13-27\_D-T [66] sowie für das Thrombin-bindende Aptamer (TBA) bekannt [59]. Für die Nukleinsäuren  $G_2T$  und  $G_4T$  wird die Ausbildung solcher Strukturen angenommen.

Aptamer [nt]	Sequenz in 5'-3'-Richtung
$G_2T$ [12]	GGTGGTGGTGGT
$G_4T$ [20]	GGGGTGGGGTGGGGTGGGGT
13-27_D-T [16]	GGGTGGGTGGGTGGG
TBA [15]	GGTTGGTGTGGTTGG

## 4. Ergebnisse

Anhand von Filterbindungsstudien sollten die Bindungseigenschaften dieser putativen G-Quadruplex-Strukturen an Hyper-IL-6 untersucht werden (Abb. 4.30).



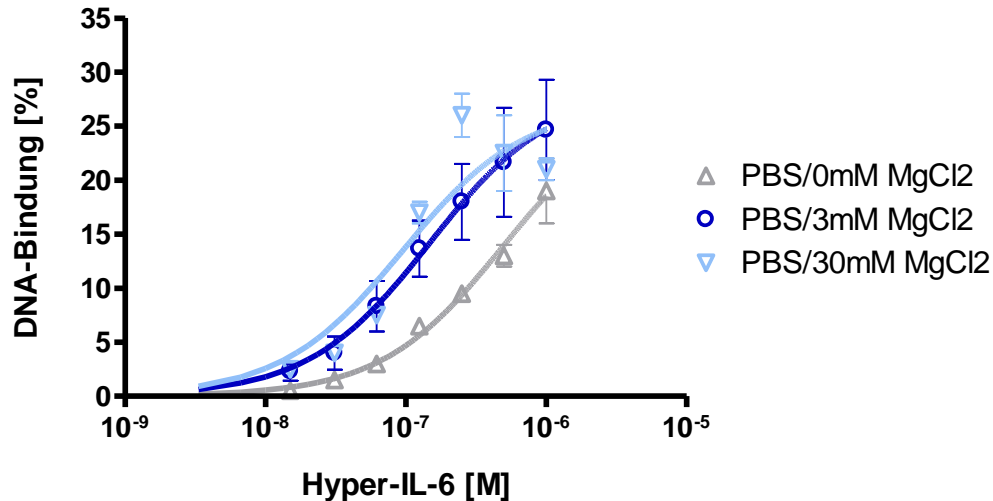
**Abb. 4.30: Analyse der Bindung G-Quadruplex-ausbildender DNA-Moleküle an Hyper IL-6.** Die in Filterbindungsstudien ermittelten prozentualen Anteile an gebundener DNA sind in Abhängigkeit definierter Hyper-IL-6 Konzentrationen aufgetragen. (logarithmische Auftragung; Einfachbestimmung.)

Die Auswertung dieser Studie zeigte, dass keines der putativen G-Quadruplexe (G<sub>2</sub>T und G<sub>4</sub>T) in der Lage, war mit dem Hyper-IL-6 zu interagieren. Auch das Thrombin-bindende DNA-Aptamer TBA mit einer ähnlichen G-reichen Sequenz zeigte keine Affinität zu dem Zielprotein. Einzig ein aus drei übereinander gestapelten G-Quartetten bestehender G-Quadruplex, das selektierte Aptamer 13-27\_D-T, konnte das Hyper-IL-6 binden. Die hier in dieser Einfachbestimmung ermittelte Dissoziationskonstante lag bei  $273 \pm 40$  nM und der Anteil maximaler DNA-Bindung bei  $43,4 \pm 3$  %.

### 4.7.7. Einfluss von Magnesiumionen auf die Aptamerbindung

Zweiwertige Kationen wie z. B. Magnesium (Mg<sup>2+</sup>) spielen eine signifikante Rolle bei der Stabilisierung von Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren [126]. Zudem beschleunigen Mg<sup>2+</sup>-Ionen konzentrationsabhängig die Assoziationsrate von Aptameren [127]. Magnesium war mit einer Endkonzentration von 3 mM im Selektionspuffer A enthalten. Zur Untersuchung einer Magnesiumabhängigkeit wurde das Aptamer 13-27\_D-T herangezogen. Ohne Zusatz von Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Selektionspuffer B) konnte eine Reduktion der Bindungsaffinität beobachtet werden (Tab. 4.11). Da dem Puffer zum Abfangen von Mg<sup>2+</sup>-Ionen kein EDTA zugefügt wurde, könnten Spuren von Mg<sup>2+</sup>-Ionen enthalten gewesen sein. In Abbildung 4.31 ist graphisch die Auswertung der Filterbindungsstudien zur Untersuchung der Magnesiumabhängigkeit dargestellt.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.31: Bindung des Aptamers 13-27\_D-T an Hyper-IL-6 in Abhängigkeit variierender MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen.** Dargestellt sind die ermittelten prozentualen Anteile an gebundenem DNA-Aptamer in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen. (logarithmische Auftragung; Daten aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten).

Das Vorhandensein hoher Konzentrationen an Mg<sup>2+</sup>-Ionen bis 30 mM (Selektionspuffer C), schienen die Aptamerbindung zu begünstigen ( $K_d \approx 96 \pm 32$  nM).

**Tab. 4.11: Aptamerbindung in Abhängigkeit variierender MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen an Hyper-IL-6.** Die gezeigten  $K_d$ -Werte und der Anteil maximal gebundener DNA wurden in zwei unabhängigen Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells ermittelt.

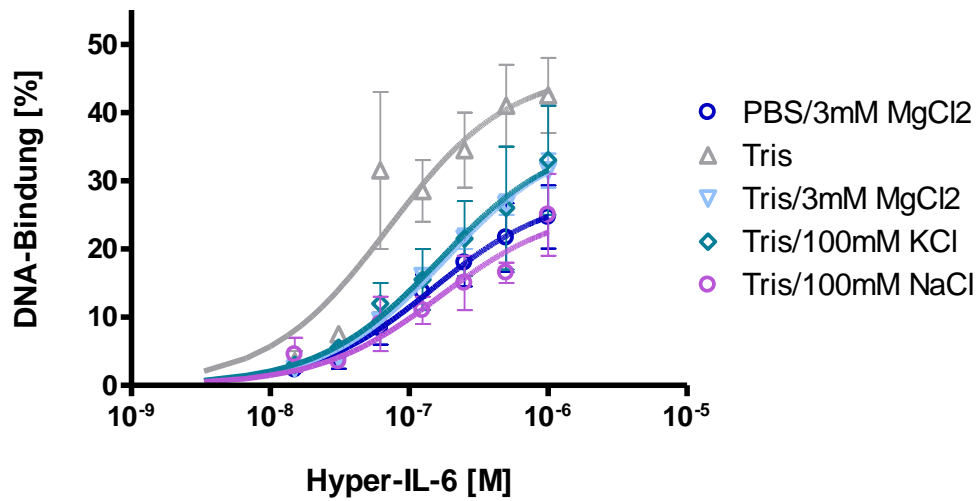
Aptamer	MgCl <sub>2</sub>	$K_d$ [nM]	Anteil maximaler Bindung [%]
13-27_D-T	0 mM	489 ± 119	27,6 ± 3
13-27_D-T	3 mM	148 ± 54	28,4 ± 3
13-27_D-T	30 mM	95,7 ± 32	27 ± 2

#### 4.7.8. Einfluss von monovalenten Kationen auf die Aptamerbindung

Die Formierung und Stabilität von G-Quadruplexen ist von einem zwischen zwei G-Quartetten achtfach koordiniertem, monovalenten Kation abhängig [72]. Sowohl K<sup>+</sup>- als auch Na<sup>+</sup>-Ionen wurden in der Literatur für viele G-Quadruplexe als potente, an der Quadruplex-Formation beteiligte und stabilisierende Kationen beschrieben, wobei jedoch den Kalium-Ionen ein höheres Potential zugeschrieben wurde [66]. Der für die Selektion verwendete Phosphatpuffer (Selektionspuffer A) beinhaltet 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl und somit alle zur Ausbildung von Quadruplexen wichtigen Kationen. In Filterbindungsstudien (3.6.1) sollte die Aptamerbindung in Abhängigkeit von K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ionen analysiert werden (Abb. 4.32). Hierfür wurde ein Tris-Puffer ohne (Tab. 4.12) oder mit

#### 4. Ergebnisse

Zusatz von 100 mM KCl bzw. 100 mM NaCl hergestellt. Der Tris-Puffer B (Tris/3 mM MgCl<sub>2</sub>) diente als Vergleich zum Selektionspuffer A (Tab. 4.12).



**Abb. 4.32: Bindung des Aptamers 13-27\_D-T an Hyper IL-6 in Abhängigkeit monovalenter Kationen.** In Filterbindungsstudien ermittelter prozentualer Anteil an gebundener DNA in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 Konzentrationen. (logarithmische Auftragung; Daten aus zwei unabhängigen Experimenten).

Die Anwesenheit von KCl bzw. NaCl oder auch Mg<sup>2+</sup>-Ionen führte zu keinem Unterschied im Bindungsverhalten des Aptamers 13-27\_D-T an Hyper-IL-6. In diesen Puffern wurden für das Aptamer Dissoziationskonstanten in etwa im Bereich einer Größenordnung zwischen 148 nM und 183 nM ermittelt (Tab. 4.12). Trotz Abwesenheit jeglicher Salze, zeigte das Aptamer 13-27\_D-T im Tris-Puffer A die höchste Affinität zu Hyper-IL-6. Hier wurde ein K<sub>d</sub>-Wert von 71 ± 28 nM determiniert. Aus diesen Filterbindungsstudien ging hervor, dass der Zusatz monovalenter Kationen keinen Einfluss auf die Aptamerbindung hatte und somit nicht zwingend notwendig war.

**Tab. 4.12: Einfluss verschiedener Salze auf die Bindung des Aptamers 13-27\_D-T an Hyper-IL-6.** Die gezeigten K<sub>d</sub>-Werte und Anteile maximal gebundener DNA (B<sub>max</sub>) wurden in zwei unabhängigen Filterbindungsstudien unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells berechnet.

Aptamer	Puffer	K <sub>d</sub> [nM]	B <sub>max</sub> [%]
13-27_D-T	1xPBS/3mM MgCl <sub>2</sub> (Selektionspuffer A)	148 ± 54	28 ± 3
13-27_D-T	1xTris (Tris-Puffer A)	71 ± 28	46 ± 5
13-27_D-T	1xTris/3mM MgCl <sub>2</sub> (Tris-Puffer B)	183 ± 22	37 ± 2
13-27_D-T	1xTris/100 mM KCl (Tris-Puffer C)	166 ± 72	37 ± 5
13-27_D-T	1xTris/100 mM NaCl (Tris-Puffer D)	168 ± 72	26 ± 4

#### 4.8. Zirkulardichroismus (CD) -Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie ist eine häufig verwendete Methode zur Konformationsermittlung chiraler Verbindungen (3.7). Mit Hilfe der CD-Spektroskopie lassen sich aufgrund unterschiedlicher CD-Spektren verschiedene Konformationen von G-Quadruplex-Strukturen darstellen. Für die selektierten Aptamere 13-27\_D und 13-27\_D-T wurden bereits CD-Spektren publiziert. Sie wurden erneut und in verschiedenen Pufferlösungen vermessen und zum Vergleich mit anderen Nukleinsäuren herangezogen. Dazu wurden zusätzlich CD-Spektren für das Aptamer 13-15\_D1 sowie einiger Mutanten und verschiedener DNA-Varianten angefertigt (Tab. 4.13). Zur Vermessung der DNA-Strukturen wurden jeweils Nukleinsäure-Lösungen einer Konzentration von 5  $\mu$ M im gewünschten Puffer hergestellt (3.7).

**Tab. 4.13: Auflistung CD-spektroskopisch vermessener Nukleinsäuren mit dazugehöriger Sequenz.**

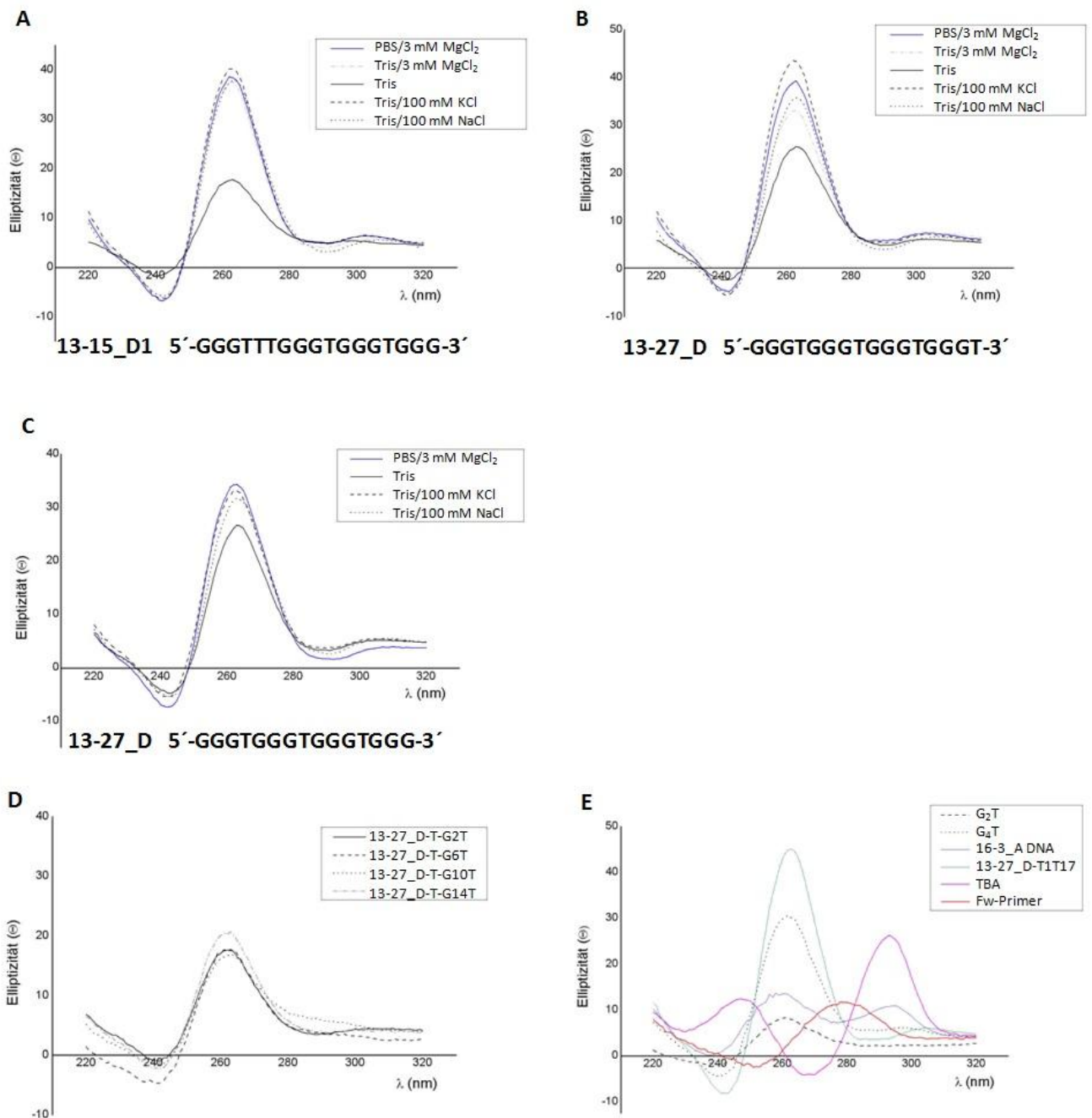
Aptamer/ Punktmutante [nt]	Sequenz 5'→3'	DNA-Variante [nt]	Sequenz 5'→3'
13-15_D1 [18]	GGGTGGGTGGGTGGGT	G2T [12]	GGTGGTGGTGGT
13-27_D [16]	GGGTGGGTGGGTGGG	G4T [20]	GGGGTGGGGTGGGGTGGGGT
13-27_D-T [15]	GGGTTTGGGTGGGTGGGT	16-3_A DNA [19]	GGGGAGGCTGTGGTGAGGG
13-27_D-T_G2T [15]	G <b>T</b> GTGGGTGGGTGGG	13-27_D-T1T17 [17]	TGGGTGGGTGGGTGGGT
13-27_D-T_G6T [15]	GGGTG <b>T</b> GTGGGTGGG	TBA [15]	GTTGGTGTGGTTGG
13-27_D-T_G10T [15]	GGGTGGGTG <b>T</b> GTGGG	Fw-D Primer [21]	GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC
13-27_D-T_G14T [15]	GGGTGGGTGGGTG <b>T</b> G		

Die für die Aptamere 13-15\_D1 (Abb. 4.33, A), 13-27\_D (B) und 13-27\_D-T (C) erhaltenen CD-Spektren zeigten in allen untersuchten Puffersystemen einen für die parallele Konformation charakteristischen Verlauf. Es konnte jeweils ein positives Signal bei etwa 265 nm und ein negatives Signal bei 240 nm beobachtet werden. Ohne Zusatz von Kationen wurde eine etwas niedrigere Amplitude vermessen (Tris). Das gleiche Ergebnis wurde für die Punktmutanten (Abb. 4.33, D) erhalten. Obwohl im vermessenen Selektionspuffer A (Tab. 2.2) alle für die Ausbildung und Stabilisierung notwendigen Kationen enthalten waren, wiesen alle Punktmutanten eine niedrige Amplitude bei 260 nm auf. In Abbildung 4.34 E sind die CD-Spektren verschiedener DNA-Varianten im Selektionspuffer A zusammengefasst. Die Varianten G<sub>4</sub>T und 13-27\_D-T1T17 zeigten ebenfalls CD-Spektren mit einem Maximum bei 260 nm und ein Minimum bei 240 nm, was einer parallelen Konformation entspricht. G<sub>2</sub>T wies einen ähnlichen Kurvenverlauf auf, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Amplitude bei



## 4. Ergebnisse

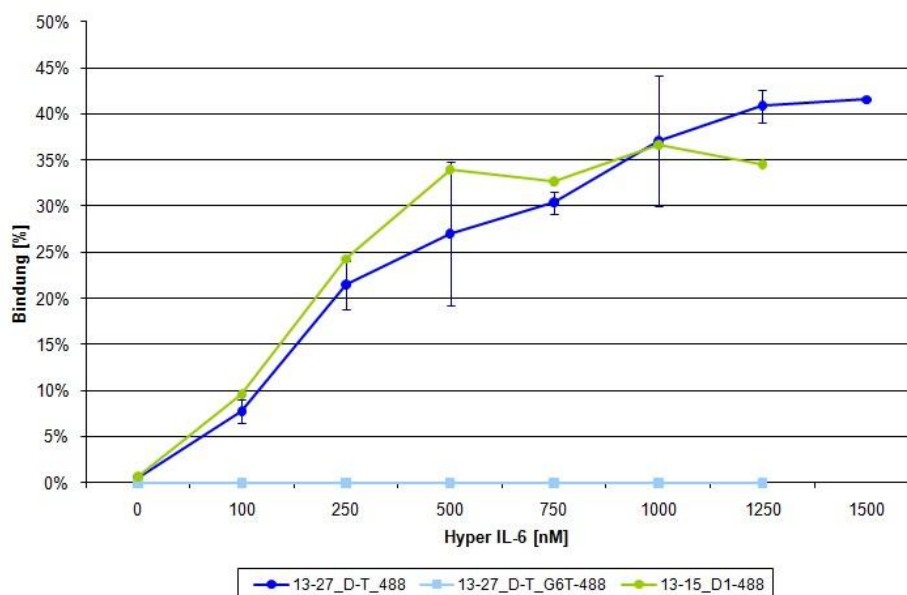
260 nm. Für die Nukleinsäuren 16-3\_A DNA und Fw-D Primer konnten CD-Spektren aufgezeichnet werden, die weder den typischen Verlauf einer parallelen noch antiparallelen Konformation aufwiesen. Das Kontroll-Aptamer TBA zeigte den aus der Literatur bekannten Kurvenverlauf der typisch für die antiparallele Konformation mit einem positiven Peak bei 290 nm und einem negativen Peak bei 260 nm ist [66].



**Abb. 4.33: CD-Spektren IL-6R-bindender Aptamere.** Vermessene CD-Spektren des Aptamers: **A)** 13-15\_D1, **B)** 13-27\_D und **C)** 13-27\_D-T in unterschiedlichen Puffersystemen. Aufgetragen ist die Elliptizität bei bestimmter Wellenlänge. Zur Analyse putativer G-Quadruplex-Strukturen wurden CD-Spektren für die Punktmutanten des 13-27\_D-T Aptamers (**D**) sowie verschiedene DNA-Varianten (**E**) in den Selektionspuffer A erstellt. Aufgetragen ist die Elliptizität bei bestimmter Wellenlänge. Die Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten zweier Scans.

#### 4.9. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und $K_d$ -Wert Bestimmung

Zur Verifizierung der Aptamerbindung an Hyper-IL-6 wurde als weitere Methode, die konfokale Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) gewählt (3.6.3). Hierfür wurden die Aptamere 13-27\_D-T, eine Punktmutante (13-27\_D-T-G6T) und 13-15\_D1 die am 3'-Ende mit AlexaFluor® 488, einem fluoreszierenden Farbstoff markiert waren verwendet. Um die Protein-Aptamer-Interaktion mittels FCS untersuchen zu können, wurde zunächst die Diffusionszeit des jeweiligen fluoreszenz-markierten, freien Aptamers (20 nM) mehrfach vermessen. Die daraus resultierenden Diffusionszeiten für die Aptamere 13-27\_D-T-488 und 13-15\_D1-488 betrug  $77 \pm 6 \mu\text{s}$  bzw.  $83 \mu\text{s}$  (hier keine Angabe der Standardabweichung da Einfachbestimmung). Für die Punktmutante  $66 \pm 2 \mu\text{s}$ . In Titrationsanalysen wurde das Protein Hyper-IL-6 in 250 nM-Schritten zu einer 20 nM Lösung des jeweiligen Aptamers pipettiert. Durch Zugabe des Proteins konnte eine konzentrationsabhängige Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit beobachtet werden, was auf eine Bindung der Aptamere an das Zielprotein hindeutete.



**Abb. 4.34: Bindung der Aptamere 13-15\_D1-488 und 13-27\_D-T-488 an Hyper-IL-6 anhand FCS-Messungen.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile an gebundenem Aptamer in Abhängigkeit der Hyper-IL-6 Konzentrationen. Die Messpunkte und Fehlerbalken für 13-27\_D-T-488 und 13-27\_D-T-G6T-488 ergaben sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen zweier unabhängiger Studien. Für 13-15\_D1 handelt es sich um eine Einfachbestimmung. Die Dissoziationskonstanten wurden anhand des GraphPad Prism® Programms unter Verwendung eines *One-Site-Binding*-Modells berechnet.

Dabei konnte eine Zunahme der Diffusionszeit für das Aptamer 13-27\_D-T-488 von  $77 \mu\text{s}$  auf  $164 \mu\text{s}$  bei einer Proteinkonzentration von  $1,25 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Für das Aptamer 13-15\_D1-488 wurde ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme der Diffusionszeit von  $83 \mu\text{s}$  ohne Protein auf  $169 \mu\text{s}$  nach Zugabe von Hyper-IL-6 ( $1,25 \mu\text{M}$ ) beobachtet. Eine solche

## 4. Ergebnisse

Zunahme der Diffusionszeit konnte für die Punktmutante nicht gemessen werden. Unter Verwendung eines Zwei-Komponenten-Modells, bei dem die ermittelte Diffusionszeit der ersten Komponente, die des freien Aptamers fixiert wird, kann der Anteil der zweiten Komponente, also des Komplexes bestimmt werden. Die mittels FCS ermittelte prozentuale Aptamerbindung an Hyper-IL-6 ist in Abhängigkeit der Hyper-IL-6 Konzentrationen in Abbildung 4.34 graphisch dargestellt.

Wie in Filterbindungsstudien gezeigt, konnte auch mittels FCS eine konzentrationsabhängige Bindung der Aptamere an Hyper-IL-6 beobachtet werden. Dissoziationskonstanten von etwa 500 nM für die Bindung des Aptamers 13-27\_D-T-488 an Hyper-IL-6 und etwa 230 nM für 13-15\_D1-488 konnten dabei ermittelt werden (Tab. 4.14). Der für das Aptamer 13-27\_D-T-488 berechnete  $K_d$ -Wert war etwas höher, als der durch Filterbindungsstudien ( $K_d$ -Wert  $\approx$  150 nM, Abb. 4.25) determinierte.

**Tab. 4.14: Mittels FCS-Messungen ermittelter Anteil maximaler Bindung und Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte).** Aufgelistet sind Mittelwerte und Standardabweichungen zwei voneinander unabhängiger Messungen für das Aptamer 13-27\_D-T-488. Bei dem Aptamer 13-15\_D1-488 handelt es sich um eine Eichfachbestimmung.

Aptamer	$K_d$ [nM]	Anteil maximaler Bindung
13-27_D-T-488	$499 \pm 6$	$55,3 \pm 6$
13-15_D1-488	$230 \pm 70$	$44 \pm 4$

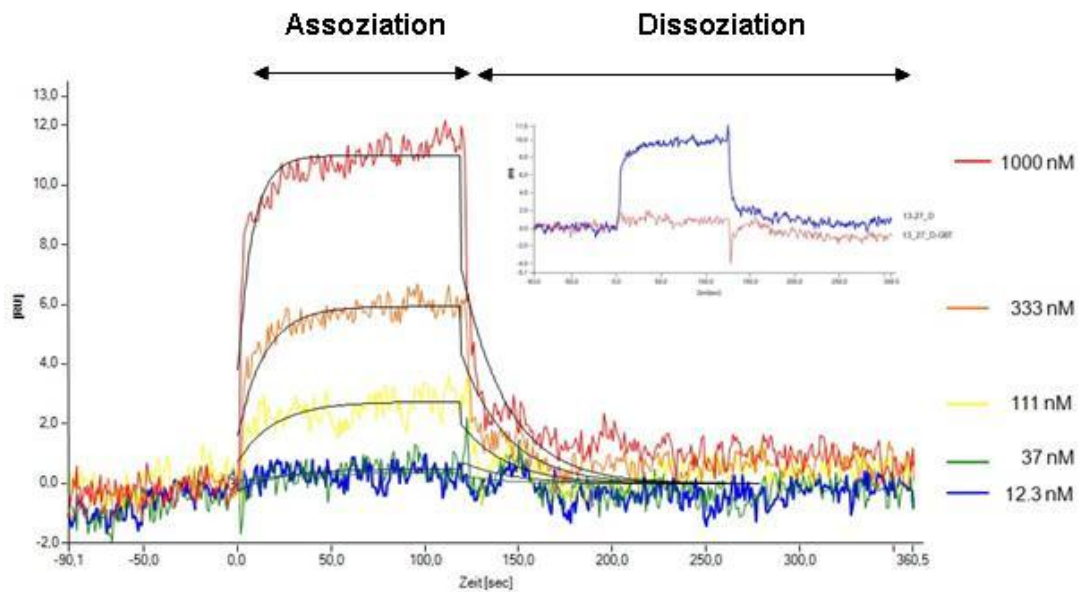
### 4.10. Verifizierung der Aptamer-Protein-Interaktion mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion von Biomolekülen zu untersuchen, beruht auf der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR; 3.6.4).

An zwei hintereinander geschalteten Sensorchips einer Durchflusszelle wurde auf die Goldoberfläche des ersten Sensors IL-6 und auf dem Zweiten das Zielmolekül Hyper-IL-6 immobilisiert (Abb. 3.1, A; 3.6.4). IL-6 wurde dabei als negative Referenz verwendet, um unspezifische Bindung vom Bruttosignal zu subtrahieren.

Das Aptamer 13-27\_D wurde für 2 min in unterschiedlichen Konzentrationen in das Flusssystem injiziert und anschließend mit dem Selektionspuffer A gewaschen. Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 4.35 dargestellt. Die SPR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Wiehler (SierraSensors GmbH) durchgeführt.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 4.35: SPR-Datenanalyse zur Bindung des Aptamers 13-27\_D an Hyper IL-6.** Die Signalstärke wird in Resonanz-Einheiten (RU) ausgedrückt und ist proportional zur gebundenen Masse an der Chipoberfläche. Die Bindung des Aptamers bei verschiedenen Konzentrationen (12,3 nM – 1000 nM) an das immobilisierte Protein Hyper IL-6 ist in Abhängigkeit der Zeit (sec) angegeben. Nach der 2 minütigen Probeninjektion ist eine sehr schnelle Dissoziation zu beobachten. Die Messergebnisse wurden global mit einem einfachen 1:1 Bindungsmodell gefittet (schwarze Linien). **Einschub:** Die Spezifität der Interaktion zwischen Aptamer 13-27\_D (-) und Hyper IL-6 wurde durch die Verwendung einer Punktmutante (13-27\_D-G6T (-)) untersucht. Die Mutante zeigte keine Affinität für das Zielprotein.

In steigenden Konzentrationen wurde das Aptamer 13-27\_D für jeweils 2 min in das Flusssystem injiziert. Dabei konnte eine sehr schnelle Assoziation, d.h. Bindung in Abhängigkeit zur Aptamerkonzentration beobachtet werden. Sobald die Aptamer-Injektion gestoppt wurde und ausschließlich mit Puffer gespült wurde, konnte ein rascher Abfall der Signalstärke, also eine schnelle Dissoziation detektiert werden. Für das Aptamer konnte eine Dissoziationskonstante von 490 nM ermittelt werden. Die Punktmutante 13-27\_D-G6T zeigte keine Affinität zum Protein (Abb. 4.35, oben). Tabelle 4.15 fasst alle mittels SPR erhaltenen Daten zusammen.

**Tab. 4.15: Kinetiken und Affinität des Aptamers 13-27\_D an Hyper IL-6 mittels SPR-Analyse.**

$K_d$ [nM]	Assoziation $k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	Dissoziation $k_d$ ( $s^{-1}$ )	$RU_{max}$
490	$8,54 \times 10^4$	$4,17 \times 10^{-2}$	10,8

Die SPR-Analyse des Aptamers 13-27\_D-T zeigte ein dem Aptamer 13-27\_D vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

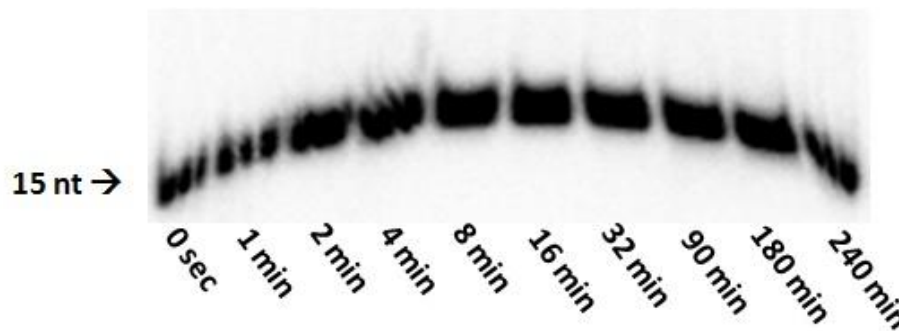
## 4. Ergebnisse

### 4.11. Analyse der Bindung mittels Durchflusszytometrie

Eine letzte Frage die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollte war, ob die selektierten Aptamere in der Lage waren, den auf der Oberfläche geeigneter Zellen präsentierten IL-6 Rezeptor zu erkennen und zu binden. Um dieses Experiment mittels Durchflusszytometrie durchführen zu können, musste vorab die Stabilität des Aptamers in Serum-enthaltendem Medium analysiert werden.

#### 4.11.1. Stabilitätstest der Aptamere in Serum-enthaltendem Medium

Das radioaktiv markierte Aptamer 13-27\_D-T (3.2.4) wurde für vier Stunden in DMEM-Medium, welches 10% FKS enthielt bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und abschließend anhand denaturierender PAGE (3.1.2) analysiert (Abb. 4.36). Das Aptamer blieb auch über vier Stunden im FKS enthaltenden Medium stabil.



**Abb. 4.36: Stabilität des DNA-Aptamers 13-27\_D-T in Zellkulturmedium.** 1 pmol des radioaktiv markierten Aptamers 13-27\_D-T wurde in 100 µL DMEM Medium mit 10% FKS bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 10 µL Aliquots (etwa 0,1 pmol) entnommen und mittels eines 15%-igen denaturierenden PAA-Gels analysiert. Die Banden wurden nach Trocknen des Gels am PhosphorImager mittels Autoradiographie visualisiert.

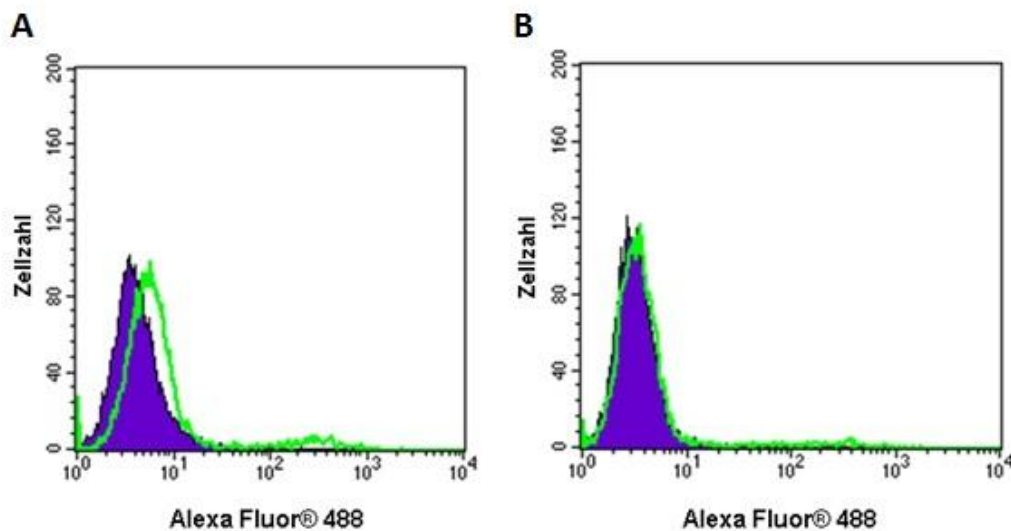
#### 4.11.2. Nachweis des IL-6R auf BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen mittels RNA-Aptamer

Für die Analyse der Aptamerbindung an IL-6R-tragende Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde die Zelllinie BAF/3 gewählt, die freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern aus Kiel zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich hierbei um murine Prä-B-Zellen die endogen keinen IL-6R produzieren. BAF/3-Zellen waren mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. zusätzlich mit der cDNA des IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL6R/TNF) stabil-transfiziert worden.

Zunächst musste die Expression des IL-6R auf der Zelloberfläche der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten die BAF/gp130-Zellen. Dies erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse unter Verwendung eines für den Rezeptor

## 4. Ergebnisse

spezifischen mit AlexaFluor® 488 markierten RNA-Aptamers [13] (3.9.1). Sowohl IL-6R-tragende als auch die Kontrollzellen (BAF/gp130) wurden mit dem fluoreszenzmarkierten Aptamer 16-3 inkubiert. Nach Abtrennung von ungebundener RNA wurden jeweils 10.000 Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Die Ergebnisse sind als Histogramme in Abb. 4.37 dargestellt.



**Abb. 4.37: Durchflusszytometrischer Nachweis der IL-6R-Expression auf BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse, wobei die gemessene Zellzahl gegen die gemessene Fluoreszenzintensität aufgetragen ist. Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten von jeweils 10.000 unmarkierten Zellen (blaue Integrale ■) wurde die Expression des IL-6R durch Bindung eines spezifischen RNA-Aptamers durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Die Verschiebung der Fluoreszenzintensität deutet auf eine Interaktion des AlexaFluor® 488-markierten RNA-Aptamers 16-3 (-) mit den IL-6R-exprimierenden BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen. **B)** Zur Kontrolle wurde die Bindung des Aptamers 16-3 (-) an IL-6R-defizienten BAF/gp130-Zellen getestet.

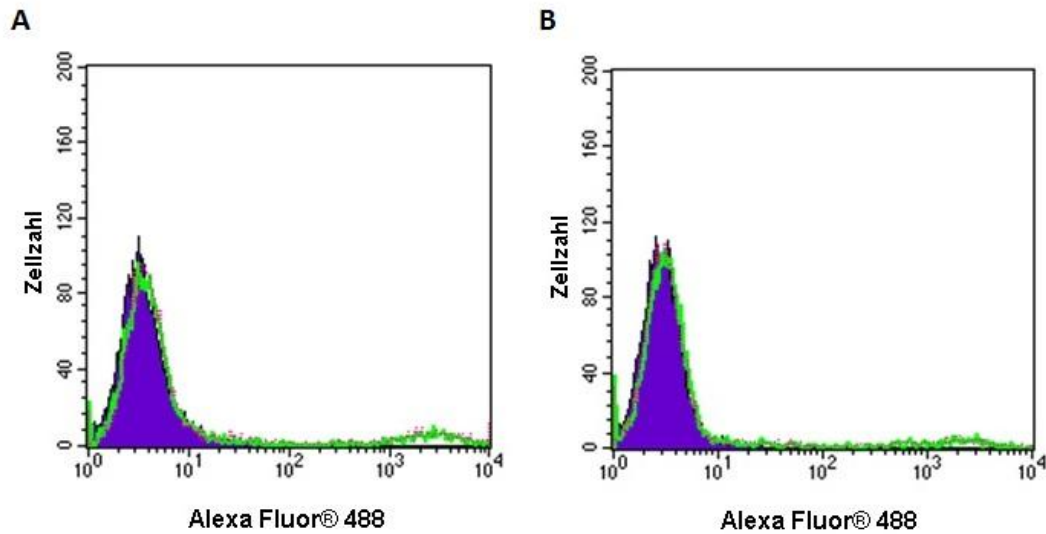
Durch die Verschiebung der Fluoreszenzintensität (Abb. 4.37, A) konnte eine Interaktion des AlexaFluor® 488-markierten RNA-Aptamers 16-3 (-) mit den IL-6R-tragenden BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nachgewiesen werden.

### 4.11.3. Bindung fluoreszenzmarkierter Aptamere an IL-6R-tragende Zellen

Folgend sollte geklärt werden, ob das IL-6R-spezifische DNA-Aptamer 13-27\_D-T den nativen IL-6R auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen binden kann. Das Aptamer und eine Punktmutante (13-27\_D-T-G6T) wurden für die Analyse mittels Durchflusszytometrie am 3'-Ende mit AlexaFluor® 488 markiert (käuflich erworben, IBA). Nach Inkubation der AlexaFluor® 488 markierten DNAs 13-27\_D-T und 13-27\_D-T-G6T mit BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen bzw. BAF/gp130-Kontrollzellen und Abtrennung ungebundener DNA wurden jeweils 10.000 Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Die Histogramme (Abb. 4.38) zeigen das Ergebnis für das Aptamer 13-27\_D-T. Es konnte eine

#### 4. Ergebnisse

Interaktion des Aptamers 13-27\_D-T (-) mit den IL-6R tragenden BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.38, A).



**Abb. 4.38: Durchflusszytometrischer Nachweis der Aptamerbindung an BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen.** Gezeigt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse, wobei die gemessene Zellzahl gegen die gemessene Fluoreszenzintensität aufgetragen ist. Nach Messung der Fluoreszenzintensitäten von jeweils 10.000 unmarkierten Zellen (blaue Integrale ■) wurde die Bindung eines spezifischen DNA-Aptamers durchflusszytometrisch analysiert. **A)** Das AlexaFluor® 488-markierte DNA-Aptamer 13-27\_D-T (-) zeigte keine Interaktion mit den IL-6R exprimierenden BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zellen. **B)** Die Kontrolle des Aptamers 13-27\_D-T (-) an IL-6R-defizienten BAF/gp130-Zellen zeigte ebenfalls keine Bindung.

Auf die Darstellung der Bindung der Punktmutante (13-27\_D-T-G6T) an die Zellen, wurde verzichtet, da ebenfalls keine Bindung gezeigt werden konnte und die Ergebnisse denen des Aptamers ähnelten.

## 5. Diskussion

### 5.1. Selektion IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, DNA-Aptamere für den IL-6R anhand des *in vitro* Selektionsverfahrens SELEX anzureichern. Zwar weisen RNA-Aptamere aufgrund ihrer 2'-OH-Gruppe eine möglicherweise größere Strukturvielfalt auf, sind aber im Gegensatz zu DNA-Aptameren anfälliger gegenüber nukleolytischem Abbau [13]. Aufgrund der größeren Stabilität von DNAs, sind diese als pharmakologische Wirkstoffe möglicherweise besser geeignet [76]. Für eine diagnostische oder therapeutische Anwendung von RNA-Aptameren, kann das Einfügen von chemischen Modifikationen, die für eine höhere Stabilität sorgen vorteilhaft sein [128]. So handelt es sich beim ersten zugelassenen Aptamer-basierten Medikament Pegaptanib, um ein stark modifiziertes (PEGyliertes, 2'-Fluor-Pyrimidin und 2'-O-Methyl-Purin) 27 nt langes RNA-Aptamer (Macugen®) [52, 129]. Pegaptanib ist gegen den humanen Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) gerichtet und wird zur Behandlung der altersbedingten, feuchten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt.

Für die Anreicherung IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere wurde eine ssDNA-Bibliothek mit ausreichend hoher Sequenzvielfalt gewählt. Die Startbibliothek D1 (Tab. 2.5) entstammte der Arbeitsgruppe von Günter Mayer und beinhaltete einen 60 nt langen randomisierten Bereich, der die Variabilität der Bibliothek bestimmte. Als Separationsmethode während des SELEX-Prozesses wurde die Verwendung von magnetischen, mit Streptavidin beschichteten Partikeln (Dynabeads®) gewählt. Sie stellen eine schnelle und effiziente Methode zur Anreicherung von DNA-Aptameren für verschiedene biotinylierte Zielproteine dar [92]. Dabei macht man sich die starke Biotin-Streptavidin-Interaktion zu Nutze [130]. Das Zielprotein, der lösliche IL-6R wurde hierfür sowohl N-terminal als auch an Lysinseitenketten biotinyliert (Abb. 4.2, 3.3.3) und an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gekoppelt (3.3.6). Mittels SDS-PAGE (3.1.1) konnte eine mögliche Degradation des Proteins, durch diese Modifikation ausgeschlossen werden (Abb. 4.3).

Die Inkubation der ssDNA-Bibliothek mit dem Zielprotein wurde im Selektionspuffer A (1xPBS/3 mM MgCl<sub>2</sub>) durchgeführt. Die eluierten ssDNA-Moleküle wurden mittels PCR unter Verwendung eines 5'-Biotin-gelabelten Primers (3.2.1; Tab. 2.5) markiert. Die resultierende doppelsträngige DNA, wurde für den Einsatz in die nächste Runde einer Strangtrennung unterzogen (3.2.3) wobei erneut auf die Anwendung von magnetischen Partikeln zurückgegriffen wurde [131]. Um den Selektionsdruck zu verstärken, wurden mit



## 5. Diskussion

jeder Selektionsrunde die Anzahl der Waschschriffe erhöht und zusätzlich ab der dritten Selektionsrunde die eingesetzten Mengen sowohl an DNA als auch an Protein reduziert (Tab. 4.1). Da während der Selektion auf eine Gegenselektion verzichtet wurde, war eine Anreicherung falsch positiver, d.h. matrixbindender DNA-Moleküle nicht auszuschließen [94]. Zur Analyse einer Anreicherung IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere wurden nach 13 Selektionsrunden erste Filterbindungsstudien (3.6.1) unter radioaktiven Bedingungen durchgeführt [92, 119].

Filterbindungsstudien unter Verwendung von Nitrozellulosemembranen stellen eine schnelle und effiziente Methode zur Determination von Dissoziationskonstanten dar [120]. Der Nachteil solcher Filterbindungsstudien allerdings ist die unspezifische Interaktion der DNA mit der Nitrozellulosemembran. Zur Minimierung dieser Bindung wurde die Membran vor der Filtration mit 0,4 M KOH behandelt [121, 132]. Um die Interaktion zwischen Aptamer und Protein genau nachweisen zu können war es notwendig, die unspezifische Bindung der DNA an die Nitrozellulosemembran separat ohne Protein zu bestimmen und von jedem einzelnen Messpunkt zu subtrahieren. Dennoch waren Schwankungen im Bezug auf Dissoziationskonstanten keine Seltenheit, die aber durch häufige Wiederholungen der Bindungsstudien reduziert werden konnten. Eine genauere Quantifizierung der DNA-Protein-Interaktion könnte die von Wong *et. al* entwickelte „Doppelfilter-Methode“ liefern. Hierbei wird ein zweites Filterpapier (DEAE) unter die Nitrozellulosemembran gebracht, welches all die DNAs auffängt die nicht an die Nitrozellulosemembran gebunden haben [122].

Die unselektierte DNA-Bibliothek aus Selektionsrunde 1 wies, im Gegensatz zur DNA-Bibliothek der Selektionsrunde 13, keine Affinität zu sIL-6R auf (Abb. 4.5), was auf eine erfolgreiche Anreicherung von sIL-6R-bindenden DNA-Aptameren deutete. Die DNA der Selektionsrunde 13 wurde kloniert (3.5) und daraus resultierende Monoklone sequenziert (3.5.7). Die Sequenzierung 18 ausgewählter Klone ergab 18 verschiedene Aptamersequenzen (Anhang Seq.). Fünf der selektierten Aptamere zeigten eine auffällige gemeinsame, G-reiche Konsensussequenz: 5'-GGGT<sub>1-3</sub>GGGYGGGTGGGW-3' (Abb. 4.7). Y kann dabei für T oder C und W für T oder A stehen. Das gehäufte Vorkommen von Guaninen spricht für eine Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen. In der Literatur sind zahlreiche Aptamere mit G-reichen Regionen beschrieben (Tab. 1.4). Besonders auffällig ist dabei die Ähnlichkeit zu dem anti-HIV-1-Integrase Aptamer, dessen charakteristische Konsensussequenz ebenfalls eine vierfache Wiederholung eines Guanin-Triplets, das jeweils von einem Thymin-Nukleotid (T-Loop) unterbrochen ist, aufweist [60]. Dieses wird in den Kapiteln 5.2, 5.4 und 5.5 im Zusammenhang mit G-Quadruplex-Strukturen eingehender diskutiert.

## 5. Diskussion

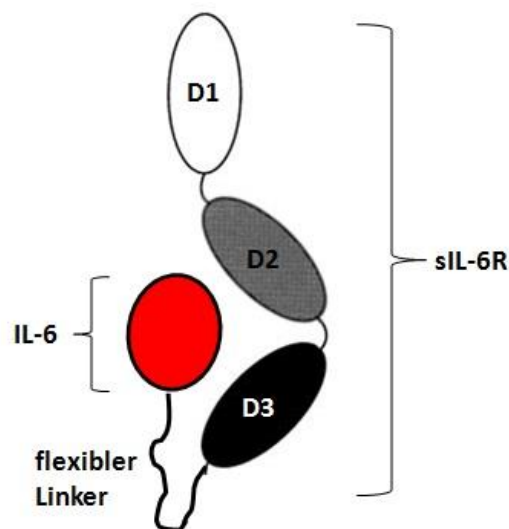
Ausgehend von diesem putativen Bindemotiv wurden erste Filterbindungsstudien mit den fünf G-reichen Aptameren (13-5, 13-11, 13-15, 13-27 und 13-32) durchgeführt. Zusätzlich wurden drei ausgewählte Nukleinsäuren (13-8, 13-19 und 13-21), die dieses Motiv nicht enthielten, getestet (Abb. 4.8). Alle fünf Aptamere, die das G-reiche Konsensusmotiv enthielten, waren in der Lage, den nicht modifizierten sIL-6R zu binden. Das weist darauf hin, dass die Guanin-haltige Konsensussequenz für die Bindung an den sIL-6R essentiell sein könnte. Aus den ersten Untersuchungen konnten Dissoziationskonstanten im Bereich von 280 nM bis etwa 1  $\mu$ M ermittelt werden (Tab. 4.2). Zur genaueren Charakterisierung der sIL-6R-Aptamer-Interaktion, wurden die Aptamere 13-15 und 13-27 mit den niedrigeren  $K_d$ -Werten herangezogen. Für beide Aptamere wurde zunächst eine Vielzahl an Filterbindungsstudien durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine hochaffine Interaktion zwischen dem Aptamer und sIL-6R mit charakteristischen  $K_d$ -Werten von 381 nM für das Aptamer 13-15 und 331 nM für 13-27 nachgewiesen (Abb. 4.10). Die Affinitäten mit denen Aptamere ihre Zielmoleküle binden, liegen meist im pikomolaren und sub-nanomolaren Bereich. In der Arbeitsgruppe Hahn konnten bereits erfolgreich RNA-Aptamere mit hoher Affinität ( $K_d \approx 19$  nM) für den sIL-6R selektiert werden [13]. Vergleichbare Affinitäten kennt man beispielsweise für das MUC1 bindende DNA-Aptamer ( $K_d$ -Wert  $\approx 0,2$  nM) [85], das den humanen Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) bindende Aptamer AP177 ( $K_d$ -Wert  $\approx 70$  pM) [133], die an die Ektodomäne des Toll-like-Rezeptors 3 (TLR3) bindenden Aptamere ( $K_d$ -Wert  $\approx 3$  nM) [134] und das den DC-SIGN-Rezeptor bindende Aptamer ( $K_d$ -Wert  $\approx 20$  nM) [91]. Weitere Aptamere die ähnliche Affinitäten für ihr Zielmolekül aufweisen, wie die in dieser Arbeit selektierten DNA-Aptamere für den sIL-6R sind z.B. RNA-Aptamere die Moenomycin A binden ( $K_d$ -Wert zwischen 300 nM und 400 nM) [37], das Prion Protein PrP<sup>C</sup> bindende DNA-Aptamere ( $K_d$ -Wert zwischen 10 nM und 1000 nM) [135], das Zellobiose bindende DNA-Aptamer ( $K_d$ -Wert  $\approx 600$  nM) [136], sowie die an die Heparin-bindende Domäne des VEGF<sub>165</sub> bindenden DNA-Aptamere ( $K_d$ -Wert zwischen 130 nM und 500 nM) [137]. Aptamere mit Affinitäten im mikromolaren Bereich konnten beispielsweise für verschiedene organische Farbstoffe (sowohl RNA als auch DNA-Aptamere mit  $K_d$ -Werten zwischen 33  $\mu$ M und 46  $\mu$ M) [27, 76], für Adenosin/ATP (RNA- und DNA-Aptamere mit  $K_d$ -Werten im Bereich von 1  $\mu$ M bis 8  $\mu$ M) [32, 33] und für das Hematoporphyrin (DNA-Aptamer,  $K_d$ -Wert  $\approx 1,3$   $\mu$ M) [62] selektiert werden.

Nachdem eine hochaffine Aptamer-Bindung an den sIL-6R gezeigt werden konnte, wurde die Spezifität der DNA-Aptamere untersucht. In Filterbindungsstudien wurde daher die

## 5. Diskussion

Interaktion der Aptamere 13-15 und 13-27 jeweils mit zwei rekombinanten Kontrollproteinen analysiert. Aus diesen Untersuchungen ging eindeutig hervor, dass die Aptamere zwischen dem Targetprotein (sIL-6R) und den Kontrollproteinen (IL-6 und CEACAM1) diskriminieren konnten (Abb. 4.12). Somit konnte gleichzeitig eine Bindung an den His-Tag des sIL-6R ausgeschlossen werden, da das CEACAM1 ebenfalls mit einem His-Tag versehen war.

Da das Fusionsprotein Hyper-IL- im Gegensatz zu sIL-6R in höheren Ausbeuten produziert werden konnte, wurde dieses für weitere Untersuchungen genutzt. Hyper-IL-6 ist ein biologisch hoch aktives Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R [14]. Dazu wurde der N-terminale Rest des IL-6 über einen 13 AS langen flexiblen Linker (reich an Glycin und Serin) an den C-Terminus des sIL-6R fusioniert (Abb. 5.1). Durch das Vorhandensein der Domänen des sIL-6R bot sich das Hyper-IL-6 als geeignete Alternative an. Allerdings musste zuvor eine Bindung der Aptamere an Hyper-IL-6 bewiesen werden.



**Abb. 5.1: Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.** Schematische Darstellung des bioaktiven Fusionsproteins Hyper-IL-6 aus IL-6 und sIL-6R, die über einen flexiblen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind. Extrazelluläre Domänen des IL-6R: D1: N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne; D2 und D3: sind Zytokin-bindende Domänen (CBD). Nach [14].

Analog den Filterbindungsstudien mit sIL-6R wurden Bindungsstudien zur Untersuchung der Interaktion der Aptamere 13-15 und 13-27 mit Hyper-IL-6 durchgeführt. Daraus resultierten Dissoziationskonstanten die denen für sIL-6R entsprachen (167 nM für 13-15, 388 nM für 13-27, Abb. 4.14). Zusätzlich implizierte dieses Ergebnis, dass die Aptamere mit dem Rezeptor an einer anderen Region als der IL-6 Bindestelle interagierten.

### 5.2. Verkürzung der IL-6R bindenden Aptamere 13-15 und 13-27

In den ersten Filterbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass das konservierte G-reiche Motiv (16 nt - 18 nt) der Aptamer für die Bindung an sIL-6R essentiell ist. Zur Identifikation wichtiger Basen für die Aptamer-Bindung an sIL-6R, wurde versucht, die Aptamere 13-15 und 13-27 unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur-Vorhersage mittels mfold zu verkürzen. Dabei wurden jeweils 4 bzw. 5 Varianten der Aptamere 13-27 bzw. 13-15 erzeugt, die mindestens das G-reiche Bindemotiv beinhalteten. Vom Aptamer 13-15 wurden folgende fünf Varianten getestet (Abb. 4.15): 13-15\_A (60 nt), 13-15\_B (35 nt), 13-15\_C (71 nt), 13-15\_D (19 nt) und 13-15\_D1 (18 nt). Für die Varianten A, C und D1 konnte eine zum Wildtyp-Aptamer vergleichbare Affinität bestimmt werden ( $K_d$ -Werte zwischen 200 nM und 400 nM, Tab. 4.3). Von den vier Varianten des Aptamers 13-27 (Abb. 4.17) konnte lediglich für das, bis auf das Bindemotiv verkürzte DNA-Aptamer 13-27\_D (16 nt) eine dem ursprünglichen *full length* Aptamer 13-27 ähnliche Bindungsaffinität determiniert werden ( $K_d$ -Wert  $\approx$  221 nM, Tab. 4.4).

Nukleinsäuren mit einem verstärkten Vorkommen an Guaninresten, können stabilisierende G-Quadruplex-Strukturen ausbilden [54, 57, 59, 61, 68] (1.2.2), wobei die Anzahl der das Bindemotiv flankierenden Basen, Einfluss auf deren Ausbildung und Stabilität haben und somit zum Verlust bzw. einer geringeren Affinität zum Zielmolekül führen könnte [138].

Aufgrund der Ergebnisse der Aptamer-Varianten 13-15\_D1 und 13-27\_D, wurden zusätzlich die G-reichen Regionen der anderen drei selektierten Aptamere (13-5/32 und 13-11) untersucht. Dabei zeigten alle bis auf das Bindemotiv verkürzten Aptamere Dissoziationskonstanten im Bereich einer Größenordnung ( $K_d$ -Werte zwischen 200 nM und 500 nM, Tab. 4.5). Diese Ergebnisse bestätigten, dass das konservierte Bindemotiv für eine Interaktion mit dem Rezeptor ausreichend war. Der Vergleich zu anderen in der Literatur gefundenen Guanin-haltigen Aptameren zeigt, dass es sich um ein wiederholt durchsetzendes Sequenzmotiv handelt. Das auch als T30695 bekannte HIV-1-Integrase-bindende DNA-Aptamer weist eine identische Sequenz zu dem hier selektierten und verkürzten Aptamer 13-27\_D auf [60, 139]. Solche G-reichen Motive wurden in einer Vielzahl anderer selektierten Aptamere gefunden (Tab. 1.4). Das Aufkommen dieser Struktur motive in Telomeren und Promoter-Regionen einiger Onkogene, weckten ein immenses Interesse an dieser Molekülklasse (1.2.2). Seit den späten 1980er Jahren sind zahlreiche Arbeiten hinsichtlich der Formierung und Wirkung von G-Quadruplex-Strukturen, sowie deren Anwendungsmöglichkeiten, insbesondere als anti-Krebs Reagenzien erschienen [68, 70, 72].

## 5. Diskussion

Zahlreiche Studien über die Struktur von T30695, dem anti-HIV-1-Integrase DNA-Aptamer, führten zu der Erkenntnis, dass es sich um einen G-Quadruplex handelt, welcher eine stabile intramolekulare, *all*-parallele Konformation mit drei planar angeordneten G-Quartetten (G-Tetraden) ausbildet [61]. Das in dieser Arbeit selektierte Aptamer 13-27\_D sollte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit, dieselbe G-Quadruplex-Struktur ausbilden.

### 5.3. Kompetitionsstudien mit Liganden des IL-6R

Interleukin-6 (IL-6) ist ein regulatorisches Zytokin, das seine Zielzellen über einen Rezeptorkomplex, bestehend aus einem Molekül IL-6R (klassisches *Signaling*) bzw. sIL-6R (*Trans-Signaling*) und zwei Molekülen gp130 stimuliert (1.6). Zunächst wird ein Komplex aus IL-6 und dem nicht direkt zur Signalgebung befähigtem Rezeptor (IL-6R) gebildet. Die Bindung des IL-6 an den Rezeptor erfolgt über die beiden Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 [12] mit einer Affinität von etwa 1 nM [14]. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne D1 wird dabei zur Bindung der Liganden und biologischen Aktivität nicht benötigt [140]. Eine Interaktion zwischen den sIL-6R-spezifischen Aptamern und dem Hyper-IL-6 legte die Vermutung nahe, dass die Aptamere an einer von der IL-6-Bindestelle unterschiedlichen Region mit dem Rezeptor interagierten. Dies wurde ebenfalls in Kompetitionsstudien belegt (Abb. 4.22). Die Bindung der sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere an den Rezeptor (sIL-6R) wurde ebenfalls nicht durch Zugabe von IL-6 als Kompetitor blockiert [13].

Als weiterer Kompetitor wurde das Glykoprotein gp130 gewählt. Wie bereits oben erwähnt gehört dieses Molekül zum Rezeptorkomplex des IL-6 und ist für die Signaltransduktion nach IL-6/IL-6R-Stimulation ins Zellinnere verantwortlich. Dabei ist die Interaktion der D3 Domäne des IL-6R mit dem gp130 für die Ausbildung eines aktiven Komplexes wichtig. Weder IL-6 noch der Rezeptor allein können gp130 aktivieren [141]. Obwohl die Domäne D3 des IL-6R eine essentielle Rolle bei der Formierung eines aktiven Komplexes spielt, zeigten die Untersuchungen von Özbek *et. al.*, dass das IL-6 auch mit der Domäne D3 alleine interagieren konnte, doch war dieser Komplex nicht in der Lage das gp130 zu aktivieren [12]. Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob die sIL-6R-spezifischen DNA-Aptamere, die Interaktion des Hyper-IL-6 zu gp130 im Bereich der Domäne D3 blockieren können. In Filterbindungsstudien konnte nach Zugabe des Kompetitors (sgp130Fc, Abb. 4.20) keine Reduktion der Aptamerbindung beobachtet werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen für die sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamere [13]. Allerdings wurde das verkürzte Aptamer 13-15\_D1 durch sgp130Fc in der Bindung um 40 % reduziert. Diese Ergebnisse führten zu

## 5. Diskussion

dem Befund, dass sowohl die DNA- als auch RNA-Aptamere IL-6R an einer von gp130 und IL-6 unabhängigen Region binden.

Die Zugabe des sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamers (16-3) [13] führte zu einer Konkurrenz mit dem DNA-Aptamer. Obwohl die RNA- und DNA-Aptamere Unterschiede in der Sequenz aufwiesen und auch wahrscheinlich unterschiedliche Strukturen ausbildeten, konkurrierten sie vermutlich um dieselbe Bindestelle am Rezeptor. Durch die höhere Affinität der RNA-Aptamere zum Rezeptor ( $K_d$ -Wert 19 nM, [13]), waren sie in der Lage, die DNA-Aptamere zu verdrängen (Abb. 4.22). Keinen Einfluss auf die Bindung der DNA-Aptamere an Hyper-IL-6 zeigte der Einsatz der ursprünglichen unselektierten DNA- bzw. RNA-Bibliotheken. Auch die Zugabe definierter Nukleinsäuren, wie beispielsweise die monoklonale einzelsträngige DNA W10 (120 nt), die einer Aptamerselektion für p53, aus der Arbeitsgruppe Hahn entstammt (unveröffentlichte Daten) oder das G-Quadruplexe ausbildende, Thrombin-bindende Aptamer (TBA, 15mer) [39] zeigten keinen Effekt. Die zuletzt genannten Untersuchungen untermauern die spezifische Interaktion der DNA-Aptamere mit dem Rezeptor.

Die Frage, wo genau die DNA-Aptamere mit dem Rezeptor interagieren und ob diese Bindung zu einem biologischen Effekt führt, bleibt in der Zukunft zu klären.

### 5.4. Charakterisierung der kurzen IL-6R-bindenden DNA-Aptamere

Es ist bekannt, dass Nukleinsäuren mit einer G-reichen Sequenz komplexe Tertiärstrukturen bilden können. Bei diesen sogenannten G-Quadruplexen handelt es sich um viersträngige Strukturen aus mehreren vertikal gestapelten G-Quartetten (G-Tetraden). Diese entstehen durch Selbstorganisation von vier Guaninresten und werden durch Bindung von monovalenten Kationen stabilisiert. Neben den Hoogsten-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen wird der Komplex durch Wechselwirkungen der G-Quartett-Stapel untereinander zusätzlich fixiert (1.2.2).

Aptamer-Varianten mit Punktmutationen in den G-Triplets sollten einen Aufschluss über die Formierung eines Quadruplex für das Aptamer 13-15\_D1 liefern. Dabei wurde deren Einfluss auf die Targetbindung untersucht. Varianten, bei denen nacheinander jeweils die mittlere Guanin-Base der G-Triplets gegen ein Thymin ausgetauscht worden war, bildeten die Grundlage dieser Studien [124].

Das Aptamer 13-27\_D sollte eine G-Quadruplex-Struktur, bestehend aus drei vertikal gestapelten G-Quartetten aus (Kap. 5.2, identische Sequenz mit dem publizierten anti-HIV-1-Integrase Aptamer T30695) bilden. Der Austausch der mittleren Base  $G_6$  im zweiten

## 5. Diskussion

G-Triplett, führte in Filterbindungsstudien zu einem Bindungsverlust (Abb. 4.23). Auch alle verwendeten Varianten des Aptamers 13-15\_D1 mit substituierten Basen G<sub>2</sub>, G<sub>8</sub>, G<sub>12</sub> und G<sub>16</sub> zeigten keine Affinität zum Rezeptor (Abb. 4.24). Spezifische Mutationen in der G-Abfolge (hier: G-Triplets), die an der Formierung der G-Quartette beteiligt waren, führten zur Destabilisierung von G-Quadruplex-Strukturen [60, 142] und waren vermutlich für den Affinitätsverlust der Aptamerbindung verantwortlich. Dieses konnte zusätzlich durch CD-Spektren der Punktmutanten verdeutlicht werden. Ein wenig stabiler Quadruplex ist durch eine niedrige Elliptizität charakterisiert. Schaut man sich die CD-Spektren der Punktmutanten an, so weisen alle eine im Vergleich zum ursprünglichen Aptamer geringere Amplitude bei 265 nm auf (Abb. 4.34, D, Kap. 5.5).

Zur weiteren Charakterisierung der Aptamerbindung wurde das Aptamer 13-27\_D (5'-GGGTGGGTGGGTGGGT-3') herangezogen. In Filterbindungsstudien sollte der Effekt von endständigen T, die das G-reiche Bindemotiv flankieren determiniert werden. Hierzu wurden neben dem Aptamer 13-27\_D mit 3'-endständigem T, drei weitere Varianten untersucht (Tab. 4.6). Für zwei dieser Varianten, eine mit 5'-endständigem T und eine ohne flankierende Thyminreste konnten zum Aptamer 13-27\_D vergleichbare Affinitäten bestimmt werden (K<sub>d</sub>-Werte von etwa 360 nM bzw. 150 nM, Tab. 4.7). Die Bindung an den Rezeptor war weder durch ein T am 5'-Ende des Bindemotivs noch durch einen Thyminrest am 3'-Ende signifikant beeinflusst. Die Ergebnisse des Aptamers 13-27\_D-T ohne endständige Ts, führten zu der Aussage, dass das Vorhandensein dieser Basen für die Aptamerbindung nicht essentiell ist. Untersuchungen von Smirnov und Shafer an einem Thrombin-bindenden Aptamer (TBA) zeigten, dass ein zusätzliches Guanin am 3'-Ende die Stabilität des Quadruplexes erhöhte, während ein G am 5'-Ende zur Destabilisierung des Komplexes führte [143].

Die dritte Variante, Thyminreste die das Bindemotiv flankierten, also sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende vorhanden waren, führten zu einem deutlichen Bindungsverlust (Abb. 4.25). Obwohl mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (3.7; 4.8) gezeigt werden konnte, dass die Variante 13-27\_DT1T17 zur Ausbildung stabiler Quadruplex-Strukturen fähig war (Abb. 4.34 E), konnte nur eine sehr geringe Affinität für den IL-6R ermittelt werden (K<sub>d</sub> > 10 μM). Dies führt zu der Annahme, dass die an beiden Enden vorhandenen Thyminreste, für die Aptamerbindung wichtige Regionen oder Basen verdecken und somit den Zugang zum Targetmolekül blockieren.

## 5. Diskussion

Eine große Anzahl G-reicher Aptamere weist eine mehrfache Wiederholung von Guanin-Abfolgen (als Dupletten, Triplets oder Quartett) auf, die hauptsächlich durch Thymin-Nukleotide voneinander getrennt werden (Tab. 1.4). Die Länge dieser Unterbrechungen (auch Loops oder Schleifen genannt) sowie deren Sequenz spielen eine wichtige Rolle bei der Art der Faltung und Stabilität von G-Quadruplexen [69]. G-reiche Oligonukleotide mit *single* T-Loops bilden sehr stabile Quadruplexe aus und präferieren die *all*-parallele Konformation [57]. Adenine sind, genau wie Cytosinreste (die über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Guaninen kompetieren können) eher selten [69]. Thyminen können über Stapelwechselwirkungen den Komplex stabilisieren und über Wasserstoffbrücken mit anderen Resten interagieren. Davis fasst in seinem Aufsatz über G-Quartette zusammen, dass „es unterschiedliche Arten von Wechselwirkung zwischen Molekülen und G-Quadruplexen gibt, aber wenige Details über die Quadruplex-Protein-Wechselwirkung“. Die meisten Wechselwirkungen bestehen mit den Loops und nicht mit dem Quadruplexkern [57]. Dabei kam die Frage auf, ob durch den Austausch der Thymin-Basen in den Loops gegen Adenine die Aptamerbindung beeinflusst wird. Um diesem nachzugehen, wurden ausgehend vom Aptamer 13-27\_D, drei Varianten auf eine Interaktion mit dem Rezeptor untersucht, bei denen nacheinander jeweils der Thymin durch Adenin ersetzt wurde (Tab. 4.8). Keine dieser Substitutionen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aptamerbindung (Abb. 4.26). Allerdings zeigte die Variante 13-27\_D-T4A, mit der Änderung im ersten Loop, ein sehr schwaches Bindungsvermögen ( $B_{max} \sim 20\%$ ) bei einer Dissoziationskonstante von etwa 470 nM. Die reduzierte Affinität ist darauf zurückzuführen, dass Adenine im ersten Loop nachteilig auf die Stabilität der Quadruplexe wirken, während das Vorkommen von Adeninen im zweiten oder dritten Loop keinen Effekt haben [144].

Eine vierte Variante war durch den Austausch des 3'-endständigen T durch ein A charakterisiert und zeigte eine deutlich reduzierte Affinität zum Rezeptor ( $K_d$ -Wert  $\approx 840$  nM).

Die Substitution aller Thyminen (13-27\_D+A) führte zu einem deutlichen Bindungsverlust ( $K_d$ -Wert  $\approx 2,6$   $\mu$ M). Arbeiten von Risitano und Fox zeigten, dass der Austausch von TTA-Loops gegen AAA zum Stabilitätsverlust der Quadruplex-Struktur in Telomeren führte [145]. Im Gegensatz dazu bildete ein Oligonukleotid, bei dem nur der erste Loop durch AAA, der zweite und dritte durch TTT ersetzt wurde, einen stabileren Quadruplex aus. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die verkürzten Aptamere 13-27\_D-T, 13-27\_D und 13-15\_D1 wurden ebenfalls auf ihre Spezifität hin untersucht. Neben dem Hyper-IL-6 wurden als Kontrollproteine IL-6, Thrombin



## 5. Diskussion

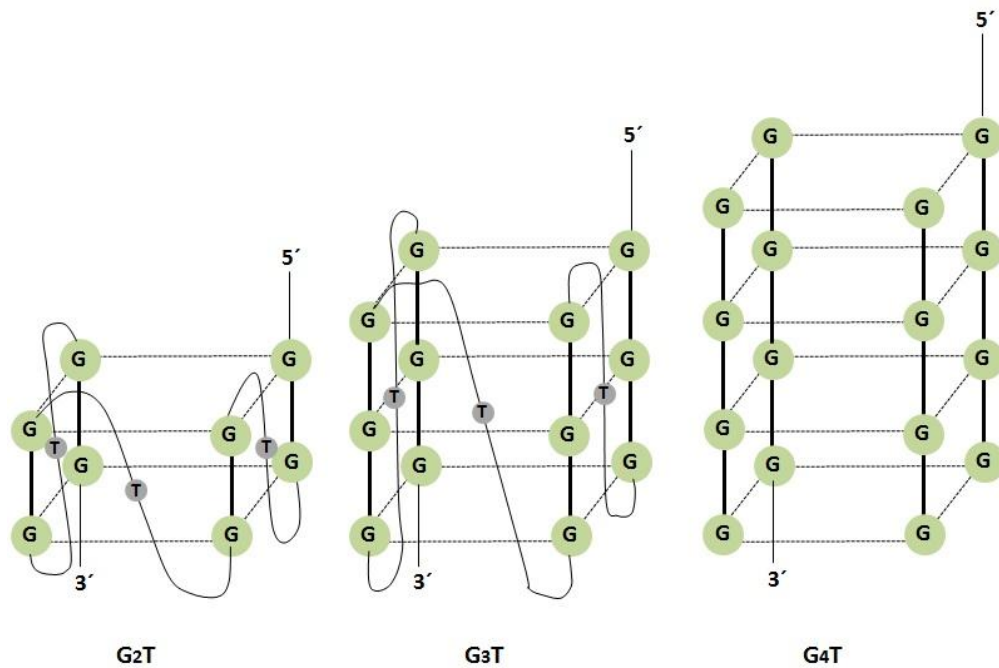
und Lysozym verwendet. Auch die kurzen Varianten der sIL-6R-spezifischen DNA-Aptamere waren in der Lage zwischen dem eigentlichen Target und den Kontrollproteinen zu diskriminieren (Abb. 4.28).

Neben den hier selektierten IL-6R-spezifischen DNA-Aptameren existieren bereits, ebenfalls G-reich, RNA-Aptamere für den Rezeptor [13]. Aus der Literatur sind wenige Beispiele für DNA- und RNA-Sequenzen bekannt, die Tertiärstrukturen mit ähnlicher bzw. vergleichbarer Funktion aufweisen. Dies ist angesichts ihrer naturbedingten Unterschiede nicht verwunderlich. In diesem Zusammenhang wurde die Vermutung geäußert, dass G-reiche Nukleinsäuren, die Quadruplexe ausbilden, vergleichbare Funktionen haben könnten. Lauhon und Szostak konnten nachweisen, dass die DNA-Variante eines RNA-Aptamers für Riboflavin, das Targetmolekül binden konnte, wenn auch mit geringerer Affinität [146]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Funktionalität der Aptamere bei Umwandlung von RNA in DNA bestehen blieb, ohne dabei einen Quadruplex als Strukturmotiv auszubilden [125]. So war die DNA-Variante des Dopamin bindenden RNA-Aptamers in der Lage, Dopamin mit ähnlicher Affinität und Spezifität zu binden. Doch sehr selten resultiert eine Umwandlung in aktiven Aptameren. Zum Beispiel konnte die DNA-Form eines ATP-bindenden RNA-Aptamers, das ATP nicht mehr binden und *vice versa* [32, 33]. Auch RNA- und DNA-Aptamere für organische Farbstoffe verloren ihre Funktion nach Überführung in die jeweilig andere Form [76].

In dieser Arbeit wurde die Interaktion eines sIL-6R-spezifischen RNA-Aptamers (16-3\_A, 5'-GGGGAGGCUGUGGUGAGGG-3', [13]) als DNA-Form mit dem Rezeptor untersucht. Eine Beibehaltung der Funktion des DNA-Moleküls konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.29).

Desweiteren stellte sich die Frage, ob die Aptamerbindung durch die Anzahl an G-Tetraden beeinflusst wird. Eine Quadruplex-Struktur aus zwei G-Quartetten, wurde für das RNA-Aptamer 16-3\_A vermutet [13]. Es gibt nur wenige Beispiele für Quadruplexe mit zwei übereinander gestapelten G-Quartetten, wie z. B. das Thrombin-bindende Aptamer (TBA) [59]. Grundsätzlich gilt, dass die Stabilität der Quadruplexe mit der Anzahl an G-Quartetten zunimmt [73]. Um dieser Aussage nachzugehen wurden G/T-reiche ssDNA-Nukleinsäuren verwendet, die sich in der Anzahl der G-Quartett-Stapel unterschieden (Abb. 5.2).

## 5. Diskussion



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung von Quadruplex-Strukturen mit unterschiedlicher Anzahl an G-Quartetten.** Gezeigt sind G-Quadruplex-Strukturen, die zwei (G<sub>2</sub>T), drei (G<sub>3</sub>T = 13-27\_D-T) bzw. vier (G<sub>4</sub>T) übereinander gestapelte G-Quartette beinhalten. Guaninbasen die ein paralleles G-Quartett ausbilden sind in grün hervorgehoben. Der Übersicht halber wurden die T-Loop bei G<sub>4</sub>T weggelassen. Quadruplexe mit einfachen Loops präferieren die *all*-parallele Konformation, d.h. alle Stränge weisen in eine Richtung.

Dass die Stabilität von der Anzahl der G-Tetraden abhängt, zeigten die Ergebnisse der CD-Spektroskopie (Abb. 4.34, Kap. 5.5). Dabei deuteten die CD-Spektren für G<sub>2</sub>T auf einen sehr instabilen G-Quadruplex hin. Untersuchungen von Rachwel und Mitarbeitern beschäftigten sich mit der Stabilität von DNA-Quadruplexen in Abhängigkeit von der Länge der sich wiederholenden G-Abfolgen. Sie stellten fest, dass die Stabilität tatsächlich von der Länge der G-Trakte abhängig ist, wobei allerdings G<sub>3</sub>T eine ungewöhnlich hohe Stabilität aufwies [147]. In Filterbindungsstudien konnte nur das für sIL-6R selektierte Aptamer (13-27\_D-T, G<sub>3</sub>T) den Rezeptor binden, während G<sub>2</sub>T keine Affinität zum Rezeptor zeigte (Abb. 4.30). Auch das sich in der Sequenz mit 13-27\_D-T ähnelnde TBA wies keine Affinität für den Rezeptor auf. Obwohl G<sub>4</sub>T stabile Komplexe ausbilden, zeigte auch diese keine Affinität zum Rezeptor. Die Anzahl der G-Quartette spielt womöglich eine wichtige Rolle bei der Aptamer-Protein-Wechselwirkung.

Neben vielen Faktoren die zur Stabilität von G-Quadruplexen beitragen, wie die Länge der G-Abfolgen [147], die Länge und Sequenz der Loops [69] spielen auch monovalente Kationen eine wichtige Rolle. Quadruplex-Strukturen werden durch die Fixierung monovalenter Kationen zwischen den Ebenen oder innerhalb der einzelnen G-Quartette zusätzlich stabilisiert (Abb. 1.8; A). Viele Publikationen beschäftigen sich mit dem Einfluss

## 5. Diskussion

verschiedener Kationen auf die Formation von Quadruplex-Strukturen und deren Konformation. Am besten sind dabei die am häufigsten in der Zelle vorkommenden  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ionen untersucht worden. Sowohl RNA- als auch DNA-G-Quadruplexe bevorzugen  $K^+$  vor  $Na^+$  [57, 72]. Die Selektivität wird dabei von der Hydratationsenergie der einzelnen Ionen bestimmt. Dadurch, dass Kalium-Ionen leichter zu dehydratisieren sind werden diese bevorzugt [65]. Um dies für die in dieser Arbeit selektierten IL-6R-spezifischen Aptamere zu verifizieren, wurde die Aptamerbindung in Abhängigkeit verschiedener Salze untersucht. Der für die Selektion verwendete PBS-Puffer (Selektionspuffer A, Tab. 2.2) beinhaltet alle zur Bildung und Stabilisierung von G-Quadruplex-Strukturen notwendigen Salze. In Filterbindungsstudien wurde zunächst die Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$ -Ionen analysiert. Im Selektionspuffer B (Tab. 2.2), dem kein Magnesium zugesetzt wurde, konnte eine leicht reduzierte Affinität des Aptamers 13-27\_D-T zum Rezeptor beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, begünstigten Magnesium-Ionen konzentrationsabhängig die Aptamerbindung (Abb. 4.31). Das Fehlen der Salze  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Mg^+$  im Tris-Puffer A (Tab. 4.12) veränderte die Bindung des Aptamers 13-27\_D-T nicht. Im Vergleich dazu, zeigten die determinierten Affinitäten des Aptamers in Puffersystemen denen entweder  $Mg^+$ ,  $K^+$  oder  $Na^+$  zugegeben worden war, dass die Aptamerbindung nicht durch das Vorhandensein dieser Ionen beeinflusst wurde (Abb. 4.32, Tab. 4.12). Das wiederum führt zu der Annahme, dass die für die hochaffine Bindung nötige definierte Quadruplex-Struktur durch die Bindung an den Rezeptor induziert oder stabilisiert wurde [35, 71].

### 5.5. CD-Spektroskopie und G-Quadruplexe

Der CD-Spektroskopie bedient man sich häufig bei der Klärung der Topologie von Quadruplex-Strukturen. Dabei weisen unterschiedliche Konformationen spezifische CD-Spektren auf, anhand derer man zwischen parallelen und anti-parallelen Strang-Orientierungen unterscheiden kann [67]. Die CD-Spektroskopie ist eine effiziente und schnelle Methode, die es erlaubt unterschiedliche Konditionen in Lösung und deren Einfluss auf die Quadruplex-Formation zu untersuchen.

Unter Verwendung der CD-Spektroskopie konnten sowohl die Konformation als *all*-parallel als auch die Abhängigkeit von  $K^+$ -Ionen, die diesen Komplex stabilisieren bestimmt werden [60, 69, 148]. Die Stabilität wird von der Höhe der Peaks bei charakteristischen Wellenlängen für die parallele bzw. anti-parallele Konformation abgeleitet. So ist eine hohe Elliptizität, also die Differenz zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht, ein Indiz für stabile G-Quadruplexe. Die in dieser Arbeit aufgenommenen CD-Spektren für die Aptamere

## 5. Diskussion

13-15\_D1 (Abb. 4.33, A), 13-27\_D (Abb. 4.33, B) und 13-27\_D-T (Abb. 4.33, C) weisen alle ein für die parallele Konformation charakteristisches Maximum bei 265 nm und ein Minimum bei 240 nm auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der Quadruplexe von dem im Puffersystem eingesetzten Kationen abhängt. Dabei zeigten die Quadruplexe in Anwesenheit von  $K^+$ -Ionen die höchste Stabilität. Die hier erzielten Ergebnisse für die Aptamere 13-27\_D (T30695 oder auch  $G_3T$ ) [60, 69, 148] und 13-27\_D-T (GQP1) [66] stimmen mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen überein. Damit konnte auch für das Aptamer 13-15\_D1 die Formierung eines G-Quadruplexes nachgewiesen werden. Sind beide Kationen ( $K^+$  und  $Na^+$ ), wie in dem Selektionspuffer A enthalten, so bildet sich ein mit dem in Anwesenheit von Kalium-Ionen vergleichbarer stabiler Komplex. Messungen im Tris-Puffer A ohne Kationen, zeigten eine geringe Elliptizität, was auf weniger stabile Quadruplexe hindeutete. Theoretisch hätte die Aptamerbindung unter diesen Bedingungen, aufgrund der unstabilen Aptamer-Struktur, entweder stark reduziert oder ganz unterbunden sein müssen. Allerdings konnte in Filterbindungsstudien gezeigt werden, dass die Aptamere auch in Abwesenheit jeglicher Struktur-stabilisierender Kationen, mit dem Rezeptor zur Interaktion fähig waren (Abb. 4.32). Dies wiederum bekräftigt die Hypothese, dass die Quadruplex-Struktur der Aptamere durch den Rezeptor induziert bzw. stabilisiert wurde.

Alle Punktmutanten (Abb. 4.33, D) bildeten instabile Quadruplexe im Selektionspuffer A aus. Durch die Mutation eines am G-Quartett beteiligten Guanins, wird nicht nur die Stabilität der Quadruplexe beeinträchtigt, sondern auch die Bindung zum IL-6R (Abb. 4.23 und 4.24).

Die geringe Elliptizität im CD-Spektrum für die Nukleinsäure  $G_2T$  (Abb. 4.33, E) untermauerte die Aussage, dass die Stabilität von zweistöckigen Quadruplexen sehr labil ist [73]. Obwohl mittels CD-Spektroskopie für die Moleküle  $G_4T$  und 13-27\_D-T1T17 die Ausbildung stabiler G-Quadruplex-Strukturen mit paralleler Strang-Orientierung gezeigt werden konnte, wiesen diese Moleküle in Filterbindungsstudien keine (Abb. 4.30) bzw. eine deutlich reduzierte Affinität (Abb. 4.25) zu IL-6R auf. Neben den Peaks, die für die parallele Konformation charakteristisch sind, konnte für das Molekül 16-3\_A DNA, der DNA-Variante des IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers, ein weiterer Peak bei 290 nm beobachtet werden. Dieser zweite Peak könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Molekül strukturell polymorph ist und ein Teil die anti-parallele Konformation einnimmt [147]. Das Thrombin-bindende Aptamer (TBA) wurde vermessen als Beispiel für die anti-parallele Konformation vermessen.

### 5.6. Nachweis der Aptamerbindung mittels FCS und SPR

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien wurden die Protein-Aptamer-Interaktionen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS; 3.6.3) und Oberflächenplasmonresonanz (SPR; 3.6.4) untersucht.

Mittels FCS wird die Diffusion einzelner fluoreszierender Moleküle in Lösung erfasst, die Aussagen über kinetische Eigenschaften der Moleküle erlauben [112]. Die Protein-Aptamer-Interaktion wurde mit Hilfe eines am 3'-Ende mit AlexaFluor<sup>®</sup> 488 fluoreszenzmarkierten Aptamers 13-27\_D-T untersucht (Tab. 2.2). Anhand von Titrationsanalysen konnte die spezifische Bindung der Aptamere 13-27\_D-T und 13-15\_D1 nachgewiesen werden, wobei in 250 nM-Schritten Hyper-IL-6 zu 20 nM Aptamer gegeben wurde (Abb. 4.34). Zunächst wurde die Diffusionszeit des jeweiligen freien Aptamers im Ein-Komponenten-Modell gemessen. Die Diffusionszeit für die Aptamere 13-27\_D-T und 13-15\_D1 betrug zwischen 77  $\mu$ s und 83  $\mu$ s, für die Negativkontrolle (13-27\_D-T\_G6T) 66  $\mu$ s. Durch die Zugabe von Hyper-IL-6 konnte eine langsamere Diffusionszeit beobachtet werden, was auf eine Bindung der Aptamere an das Protein deutete. Unter Verwendung des Zwei-Komponenten-Modells konnte der Anteil des Komplexes bestimmt werden. Durch Zugabe des Proteins zum Aptamer, konnte eine konzentrationsabhängige Bindung detektiert werden (Abb. 4.34). Für die Negativkontrolle konnte keine Affinität zu Hyper-IL-6 nachgewiesen werden. Die  $K_d$ -Werte der beiden untersuchten Aptamere wurden unter Verwendung der GraphPad Prism<sup>®</sup> Software ermittelt und lagen im Bereich von 230 nM für 13-15\_D1 und etwa 500 nM für das Aptamer 13-27\_D-T. Obwohl die Dissoziationskonstante des Aptamers 13-27\_D-T einen höheren Wert im Vergleich zu dem in Filterbindungsstudien ermittelten aufwies, lagen diese Werte im Bereich einer Größenordnung, was eine spezifische Bindung des Aptamers an den Rezeptor bestätigte.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Aptamer-Interaktionen besteht in der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR; 3.6.4). Mit Hilfe dieser markierungsfreien Methode können neben der Bindungsaffinität auch weitere Parameter wie die Assoziations- und Dissoziations-Rate in Echtzeit ermittelt werden. An zwei Sensorchips einer Durchflusszelle wurden jeweils IL-6 bzw. Hyper-IL-6 immobilisiert (Abb. 3.1, A). Dabei wurde der zweite Sensor mit dem immobilisierten IL-6 als negative Referenzoberfläche verwendet. Unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Aptamers (13-27\_D) wurden in das Flusssystem injiziert und über beide Sensoren geführt. Während der 2-minütigen Injektion des Aptamers konnte eine sehr schnelle Assoziation detektiert werden. Sobald die Injektion gestoppt und

## 5. Diskussion

mit Puffer gespült worden war, konnte ein rascher Abfall in der Signalstärke, also eine schnelle Dissoziation beobachtet werden (Abb. 4.35). Um den  $K_d$ -Wert zu bestimmen, wurden die erhaltenen Messergebnisse für die Assoziation und Dissoziation global mit einem einfachen 1:1 Langmuir Bindungsmodell gefittet. Die daraus resultierende Dissoziationskonstante von 490 nM entsprach dem mittels FCS ermittelten Wert.

Eine Studie über die Interaktion zwischen humanem IgE und einem spezifischen DNA-Aptamer lieferte vergleichbare Daten [149]. Allerdings wurde hier das DNA-Aptamer auf der Goldoberfläche eines Chips immobilisiert. Und obwohl eine hohe Affinität zum IgE ermittelt wurde ( $K_d$ -Wert 134 nM) dissoziierte dieser Komplex sobald mit Puffer gespült wurde. Anders dagegen verhielten sich die IL-6R-spezifischen RNA-Aptamere (Cindy Meyer, persönliche Mitteilung) [114]. Eine etwas langsamere im Vergleich zu den DNA-Aptameren Assoziation wurde während der 2-minütigen Injektion des RNA-Aptamers (16-3, 106 nt) beobachtet. Nach Beendigung der Injektion dissoziierte dieser Komplex sehr viel langsamer als die DNA-Aptamere. Mittels SPR konnte eine Dissoziationskonstante von 1,7 nM (Filterbindungsstudien: 19 nM) ermittelt werden. Eine langsamere Dissoziation ließe sich durch die Länge des Aptamers erklären. Das RNA-Aptamer mit einer Länge von 106 nt war 90 Nukleotide länger als das DNA-Aptamer (16 nt). Einen Anhaltspunkt dafür liefern die Ergebnisse von *Wochner et. al* [35]. Mittels SPR wurde die Interaktion zwischen dem Daunomycin-bindendem DNA-Aptamer 10.10 (80 nt) und Daunomycin untersucht. Auf einen mit Streptavidin beschichteten Sensorchip wurde das biotinylierte Daunomycin immobilisiert. Unterschiedliche Konzentrationen des Aptamers wurden in das Flusssystem injiziert. Dabei konnte eine Assoziationsrate beobachtet werden, die der IL-6R-spezifischen RNA-Aptamere ähnelte. Auch die Dissoziationskonstante war mit der der RNA-Aptamere vergleichbar ( $K_d$ -Wert 20 nM). Untersuchte man die Bindung einer verkürzten Variante des Aptamers, die nur noch 40 Nukleotide lang war, so wurde neben einer etwas reduzierten Affinität ( $K_d$ -Wert 272 nM) eine 10-fach beschleunigte Dissoziation beobachtet [35].

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

*In vivo veritas.* Die spezifische Interaktion zwischen den in dieser Arbeit selektierten DNA-Aptamere mit sIL-6R bzw. Hyper-IL-6 konnte anhand einer Vielzahl an *in vitro* Experimenten gezeigt und bestätigt werden. Abschließend sollte überprüft werden, ob die Aptamere in der Lage waren den nativen, membranständigen IL-6R auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen zu binden. Da sich sIL-6R, der für die Selektion verwendet wurde, nur durch das Fehlen der zytoplasmatischen und intrazellulären Domäne vom membranständigen

## 5. Diskussion

unterschied, sollten die sIL-6R-spezifischen DNA-Aptamere ebenfalls zur Erkennung des membranständigen befähigt sein. Um dieser Frage nachzugehen wurden durchflusszytometrische Analysen an geeigneten Zellen durchgeführt. Hierfür wurden BAF/3 Zellen genutzt die mit der cDNA für gp130 (BAF/gp130) bzw. zusätzlich mit der cDNA des IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL6R/TNF) stabil-transfiziert worden waren. Die transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von Professor Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Durchflusszytometrie stellt eine sensitive und schnelle Methode dar, die mehrfach Anwendung bei der Untersuchung von Zell-spezifischen Interaktionen mit Nukleinsäuren fand [105, 106, 133].

Für den Nachweis der IL-6R Präsentation auf der Zelloberfläche wurde das IL-6R-spezifische mit AlexaFluor<sup>®</sup> 488 markierte RNA-Aptamer 16-3 verwendet. Im Rahmen ihrer Promotionsarbeit konnte Frau Meyer bereits zeigen, dass das RNA-Aptamer 16-3 den membranständigen IL-6R auf der Oberfläche von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen erkennen und binden konnte [13]. Da das RNA-Aptamer innerhalb weniger Sekunden in FKS-enthaltendem Medium degradiert wurde, mussten die durchflusszytometrischen Analysen im Selektionspuffer A durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu waren die DNA-Aptamere auch nach vier Stunden im Medium mit FKS stabil (Abb. 4.36). Ein Nukleolin-bindendes G-reiches Oligonukleotid war selbst nach fünf Tagen in Serum-enthaltendem Medium intakt [150].

Sowohl die den IL-6R präsentierenden als auch die Kontrollzellen (BAF/gp130) wurden mit dem RNA-Aptamer inkubiert und nach Trennung ungebundener RNA wurden jeweils 10.000 Zellen vermessen. Durch die Verschiebung des Peaks zu höheren Fluoreszenzwerten (Abb. 4.37, A) konnte eine spezifische Bindung des RNA-Aptamers an den auf der Oberfläche der Zellen präsentierten IL-6R detektiert werden. Ein solcher *Shift* konnte nicht bei den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 4.37, B). Dies bewies eine spezifische Interaktion des RNA-Aptamers mit dem membranständigen IL-6R und implizierte somit den Nachweis der IL-6R Präsentation auf der Zelloberfläche.

Unter denselben Bedingungen wurde das Experiment mit dem AlexaFluor<sup>®</sup> 488 markiertem DNA-Aptamer 13-27\_D-T durchgeführt. Hier konnte allerdings hier keine Verschiebung der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abb. 4.38) und somit keine Bindung des Aptamers an den nativen, membranständigen Rezeptor gezeigt werden. Ein Grund hierfür könnte die schnelle Dissoziation sein, die mittels SPR detektiert wurde.

## 6. Ausblick

Ähnlich wie Antikörper können Aptamere aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung ihre Zielmoleküle hoch affin und spezifisch binden und gegebenenfalls deren biologische Funktionen inhibieren. Im Gegensatz zu Antikörpern lassen sich Aptamere in einen *in vitro* Selektionsprozess anreichern, können mannigfaltig modifiziert werden, sind weder toxisch noch immunogen und lassen sich chemisch in großen Mengen einfach synthetisieren. Aufgrund ihrer Eigenschaften haben Aptamere ein immenses Anwendungspotenzial und repräsentieren eine viel versprechende Klasse neuartiger Therapeutika.

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Selektion IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere als putative Therapeutika und Pendant zur Antikörper-Technologie, bei der Behandlung IL-6R-bedingter Erkrankungen.

Die Anreicherung hochaffiner IL-6R-spezifischer DNA-Aptamere, sowie deren Charakterisierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Unter Beibehaltung der Affinität zum Rezeptor konnten die Aptamere bis auf das konservierte G-reiche Bindemotiv verkürzt werden. Doch nicht alle aufkommenden Fragestellungen konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit beantwortet werden. Diese gilt es zukünftig zu klären.

Bisher konnte die Frage nicht beantwortet werden, wo genau die DNA-Aptamere den Rezeptor binden. Da gezeigt werden konnte, dass die DNA-Aptamere nicht mit den Liganden des IL-6R kompetieren, könnte die Bindung der Aptamere an die Zytokin-bindenden Domänen D2 und D3 theoretisch ausgeschlossen werden. Ob daraus geschlossen werden kann, dass die Aptamere mit der Domäne D1 des Rezeptors interagieren, bleibt spekulativ. Durch Interaktionsstudien mit den einzelnen Domänen D1, D2 und D3 ließe sich die Bindungsregion der Aptamere determinieren.

Auf Ebene der Aptamere kann in sogenannten *Footprint*-Experimenten durch chemische Modifikation der DNA mittels DMS oder DNase 1 (*chemical probing*), oder aber durch gerichtete Mutagenese mittels UV-Bestrahlung die an der Interaktion mit dem Protein beteiligten Basen bestimmt werden [30, 151]. Mittels *docking calculation*, einer Methode bei der die Aptamer-Protein-Wechselwirkungen simuliert und analysiert werden, können Bindungsmodelle der Liganden-Komplexe berechnet werden [152]. Detaillierte Aussagen über die dreidimensionale Wechselwirkung zwischen den DNA-Aptameren und IL-6R könnten schließlich kristallographische Strukturanalysen liefern.



## 6. Ausblick

Die wahrscheinlich wichtigste Frage, welchen biologischen Effekt die Bindung der DNA-Aptamere an IL-6R in Bezug auf die IL-6-stimulierte Signaltransduktion bzw. Zellproliferation hat, gilt es in Zukunft zu klären.

Zur Beantwortung dieser Frage könnten Proliferationsstudien herangezogen werden. Dabei würde die IL-6-vermittelte Zellproliferation von BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen in Anwesenheit der IL-6R-spezifischen DNA-Aptamere untersucht werden. Würde die IL-6-vermittelte Signalgebung durch die Aptamere blockiert, so würde sich dies auf die Zellproliferation negativ auswirken. Eine weitere Möglichkeit böte die Untersuchung an HepG2-Hepatomzellen, die bei Stimulation durch den IL-6/IL-6R-Komplex Akute-Phase-Proteine produzieren [123]. Die Sekretion dieser Proteine wäre inhibiert, würden die Aptamere den IL-6/IL-6R-Stimulus blockieren.

Sollten die Aptamere nach Bindung an den IL-6R in das Zellinnere internalisiert werden, so könnten diese als Vehikel für verschiedene therapeutische Wirkstoffe wie Toxine, Doxorubicin oder Nanopartikel und deren Zell-spezifischen Aufnahme dienen [153, 154]. Beispielweise könnten Chimären aus definierten siRNAs und den IL-6R-spezifischen DNA-Aptameren zur Aufnahme funktioneller siRNAs in Zellen führen. Hier könnten diese nach Prozessierung durch Dicer spezifische mRNAs gezielt ausschalten. Eine erfolgreiche Anwendung solcher Chimären konnte McNamara *et al.* nach Kopplung PSMA-spezifischer Aptamere an siRNAs zeigen [155].

Für eine spätere Anwendung der IL-6R-spezifischen DNA-Aptamere wäre es wichtig, die mittels SPR ermittelte Dissoziationsrate des Aptamer-Protein-Komplexes zu verlangsamen. Vielleicht ließe sich die Stabilität der Bindung durch eine gezielte Modifikation des Aptamers am 5'- oder 3'-Ende mit Polyethylenglykol-Einheiten (PEG) erhöhen, indem ihr Molekulargewicht vergrößert wird [47, 129]. Als weitere Alternative sollte die Verlängerung der Aptamere in Betracht gezogen werden [35].

## 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. Taga, T., *IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130*. Res Immunol, 1992. 143(7): p. 737-9.
3. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 2006. 8 Suppl 2: p. S2.
4. Morrone, G., et al., *Recombinant interleukin 6 regulates the transcriptional activation of a set of human acute phase genes*. J Biol Chem, 1988. 263(25): p. 12554-8.
5. Zhang, Y., J.X. Lin, and J. Vilcek, *Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP*. J Biol Chem, 1988. 263(13): p. 6177-82.
6. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction*. Z Ernährungswiss, 1998. 37 Suppl 1: p. 43-9.
7. 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.
8. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Medical microbiology and immunology, 2006. 195(4): p. 173-83.
9. Ancey, C., et al., *A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor*. J Biol Chem, 2003. 278(19): p. 16968-72.
10. 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.
11. Grotzinger, J., et al., *IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?* Biol Chem, 1999. 380(7-8): p. 803-13.
12. 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.
13. Meyer, C., *Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamere*. Dissertation, 2009.
14. Fischer, M., et al., *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nature biotechnology, 1997. 15(2): p. 142-5.

15. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. Journal of leukocyte biology, 2006. 80(2): p. 227-36.
16. 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.
17. Mullberg, J., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol, 1993. 23(2): p. 473-80.
18. Matthews, V., et al., *Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)*. J Biol Chem, 2003. 278(40): p. 38829-39.
19. Scheller, J., Grötzinger, J. und Rose-John, S., *Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren*. BIOSpektrum, 2007. 03.07(13. Jahrgang).
20. Horiuchi, S., et al., *Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism*. Eur J Immunol, 1994. 24(8): p. 1945-8.
21. 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.
22. Kotake, S., et al., *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation*. J Bone Miner Res, 1996. 11(1): p. 88-95.
23. 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.
24. Genovese, M.C., et al., *Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study*. Arthritis Rheum, 2008. 58(10): p. 2968-80.
25. Rubbert-Roth, *Tocilizumab bei rheumatoider Arthritis: Interleukin-6 als neues Target*. Arzneimitteltherapie, 2009. 27. Jahrgang(Heft 10): p. 299-306.
26. Peters, M., et al., *In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6*. J Immunol, 1998. 161(7): p. 3575-81.

27. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. 346(6287): p. 818-22.
28. Majumder, P., K.N. Gomes, and H. Ulrich, *Aptamers: from bench side research towards patented molecules with therapeutic applications*. Expert Opin Ther Pat, 2009. 19(11): p. 1603-13.
29. 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.
30. Wilson, C. and J.W. Szostak, *Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity*. Chem Biol, 1998. 5(11): p. 609-17.
31. Holeman, L.A., et al., *Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers*. Fold Des, 1998. 3(6): p. 423-31.
32. Huizenga, D.E. and J.W. Szostak, *A DNA aptamer that binds adenosine and ATP*. Biochemistry, 1995. 34(2): p. 656-65.
33. Sassanfar, M. and J.W. Szostak, *An RNA motif that binds ATP*. Nature, 1993. 364(6437): p. 550-3.
34. Harada, K. and A.D. Frankel, *Identification of two novel arginine binding DNAs*. EMBO J, 1995. 14(23): p. 5798-811.
35. Wochner, A., et al., *A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines*. Anal Biochem, 2008. 373(1): p. 34-42.
36. Niazi, J.H., et al., *ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline*. Bioorg Med Chem, 2008. 16(3): p. 1254-61.
37. Schurer, H., et al., *Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2001. 9(10): p. 2557-63.
38. 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.
39. Bock, L.C., et al., *Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin*. Nature, 1992. 355(6360): p. 564-6.
40. 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.

41. 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.
42. Tang, J., et al., *The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods*. Electrophoresis, 2006. 27(7): p. 1303-11.
43. Raddatz, M.-S.L., et al., *Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting*. Angewandte Chemie (International ed in English), 2008. 47(28): p. 5190-3.
44. 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.
45. Cao, X., et al., *Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(14): p. 4621-8.
46. Bruno, J.G. and J.L. Kiel, *In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection*. Biosensors & bioelectronics, 1999. 14(5): p. 457-64.
47. Mayer, G., *Nukleinsäuren im Drug Discovery Prozess: Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche*. Pharm. unserer Zeit, 2007. 6/2007(36): p. 432-436.
48. Mayer, G., *The chemical biology of aptamers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(15): p. 2672-89.
49. Dausse, E., S. Da Rocha Gomes, and J.J. Toulme, *Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline?* Curr Opin Pharmacol, 2009. 9(5): p. 602-7.
50. Thiel, K.W. and P.H. Giangrande, *Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers*. Oligonucleotides, 2009. 19(3): p. 209-22.
51. Lee, J.F., G.M. Stovall, and A.D. Ellington, *Aptamer therapeutics advance*. Curr Opin Chem Biol, 2006. 10(3): p. 282-9.
52. 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.
53. Vinores, S.A., *Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration*. Int J Nanomedicine, 2006. 1(3): p. 263-8.
54. Bates, P.J., et al., *Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer*. Experimental and molecular pathology, 2009. 86(3): p. 151-64.

55. Han, H. and L.H. Hurley, *G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design*. Trends Pharmacol Sci, 2000. 21(4): p. 136-42.
56. Bates, P.J., E.W. Choi, and L.V. Nayak, *G-rich oligonucleotides for cancer treatment*. Methods Mol Biol, 2009. 542: p. 379-92.
57. Davis, J.T., *40 Jahre G-Quartetts: von 5'-GMP zur Molekularbiologie und Supramolekularen Chemie*. Angewandte Chemie 2004(116): p. 684-716.
58. Lane, A.N., et al., *Stability and kinetics of G-quadruplex structures*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(17): p. 5482-515.
59. Macaya, R.F., et al., *Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(8): p. 3745-9.
60. Jing, N., et al., *Ion selective folding of loop domains in a potent anti-HIV oligonucleotide*. Biochemistry, 1997. 36(41): p. 12498-505.
61. Li, M.H., et al., *The 3D structures of G-Quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors: molecular dynamics simulations in aqueous solution and in the gas phase*. J Mol Model, 2009.
62. Okazawa, A., et al., *In vitro selection of hematoporphyrin binding DNA aptamers*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2000. 10(23): p. 2653-6.
63. Mann, D., et al., *In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. 338(4): p. 1928-34.
64. Bates, P.J., et al., *Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding*. J Biol Chem, 1999. 274(37): p. 26369-77.
65. Hud, N.V., et al., *The selectivity for K<sup>+</sup> versus Na<sup>+</sup> in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR*. Biochemistry, 1996. 35(48): p. 15383-90.
66. 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.
67. Burge, S., et al., *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(19): p. 5402-15.
68. Bates, P., J.L. Mergny, and D. Yang, *Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA*. EMBO Rep, 2007. 8(11): p. 1003-10.
69. Hazel, P., et al., *Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes*. J Am Chem Soc, 2004. 126(50): p. 16405-15.
70. Huppert, J.L., *Four-stranded DNA: cancer, gene regulation and drug development*. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2007. 365(1861): p. 2969-84.

71. Nagatoishi, S., Y. Tanaka, and K. Tsumoto, *Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 352(3): p. 812-7.
72. Qin, Y. and L.H. Hurley, *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions*. *Biochimie*, 2008. 90(8): p. 1149-71.
73. Huppert, J.L. and S. Balasubramanian, *Prevalence of quadruplexes in the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(9): p. 2908-16.
74. 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.
75. 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.
76. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures*. *Nature*, 1992. 355(6363): p. 850-2.
77. Helmholz, *FluMag-SELEX*. [www.ufz.de/index.php?de=18568](http://www.ufz.de/index.php?de=18568).
78. Gold, L., et al., *Diversity of oligonucleotide functions*. *Annu Rev Biochem*, 1995. 64: p. 763-97.
79. Gopinath, S.C., *Methods developed for SELEX*. *Anal Bioanal Chem*, 2007. 387(1): p. 171-82.
80. Pristoupil, T.I. and M. Kramlova, *Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes*. *J Chromatogr*, 1968. 32(4): p. 769-70.
81. Tasset, D.M., M.F. Kubik, and W. Steiner, *Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes*. *Journal of molecular biology*, 1997. 272(5): p. 688-98.
82. Marozzi, A., et al., *In vitro selection of HIV-1 TAR variants by the Tat protein*. *J Biotechnol*, 1998. 61(2): p. 117-28.
83. Ulrich, H., et al., *In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. 95(24): p. 14051-6.
84. Vianini, E., M. Palumbo, and B. Gatto, *In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001. 9(10): p. 2543-8.

85. Ferreira, C.S.M., C.S. Matthews, and S. Missailidis, *DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers*. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2006. 27(6): p. 289-301.
86. Mendonsa, S.D. and M.T. Bowser, *In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis*. *Analytical chemistry*, 2004. 76(18): p. 5387-92.
87. Mosing, R.K., S.D. Mendonsa, and M.T. Bowser, *Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase*. *Anal Chem*, 2005. 77(19): p. 6107-12.
88. Tsukakoshi, K., et al., *Screening of DNA aptamer which binds to alpha-synuclein*. *Biotechnol Lett*, 2010.
89. 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.
90. 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.
91. Hui, Y., et al., *Selection of DNA aptamers against DC-SIGN protein*. *Mol Cell Biochem*, 2007. 306(1-2): p. 71-7.
92. Mayer, G. and T. Hover, *In vitro selection of ssDNA aptamers using biotinylated target proteins*. *Methods in molecular biology (Clifton, N J)*, 2009. 535: p. 19-32.
93. Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. 383(1): p. 83-91.
94. Wochner, A., et al., *Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling*. *Biotechniques*, 2007. 43(3): p. 344, 346, 348 passim.
95. Cox, J.C. and A.D. Ellington, *Automated selection of anti-protein aptamers*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001. 9(10): p. 2525-31.
96. Invitrogen, [www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal.html).
97. Niazi, J.H., S.J. Lee, and M.B. Gu, *Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2008. 16(15): p. 7245-53.
98. Golden, M.C., et al., *Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers*. *J Biotechnol*, 2000. 81(2-3): p. 167-78.



99. Singer, B.S., et al., *Libraries for genomic SELEX*. Nucleic Acids Res, 1997. 25(4): p. 781-6.
100. Shtatland, T., et al., *Interactions of Escherichia coli RNA with bacteriophage MS2 coat protein: genomic SELEX*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(21): p. E93.
101. Morris, K.N., et al., *High affinity ligands from in vitro selection: complex targets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. 95(6): p. 2902-7.
102. Shamah, S.M., J.M. Healy, and S.T. Cload, *Complex target SELEX*. Acc Chem Res, 2008. 41(1): p. 130-8.
103. Daniels, D.A., et al., *A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(26): p. 15416-21.
104. Shangguan, D., et al., *Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. 103(32): p. 11838-43.
105. Tang, Z., et al., *Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells*. Anal Chem, 2007. 79(13): p. 4900-7.
106. Mayer, G., *FACS-SELEX zur Identifikation zellspezifischer Aptamere*. BIOSpektrum, 2009. 03.09(15. Jahrgang): p. 276-278.
107. Klug, S.J. and M. Famulok, *All you wanted to know about SELEX*. Mol Biol Rep, 1994. 20(2): p. 97-107.
108. Mairal, T., et al., *Aptamers: molecular tools for analytical applications*. Anal Bioanal Chem, 2008. 390(4): p. 989-1007.
109. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
110. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(13): p. 3406-15.
111. Schwille and Bacia, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Messung von Proteininteraktionen in situ*. Zellbiologie aktuell, 2003. 29. Jahrgang(Ausgabe 3/2003).
112. Breusegem, S.Y., M. Levi, and N.P. Barry, *Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy*. Nephron Exp Nephrol, 2006. 103(2): p. e41-9.

113. Weisshart, K., V. Jungel, and S.J. Briddon, *The LSM 510 META - ConfoCor 2 system: an integrated imaging and spectroscopic platform for single-molecule detection*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004. 5(2): p. 135-54.
114. SierraSensors, *The SPR-2 Biomolecular Interaction Analysis Systems*. Confidential, SierraSensors, 2010.
115. SierraSensors, [www.sierrasensors.com](http://www.sierrasensors.com).
116. Balagurumoorthy, P., et al., *Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences*. *Nucleic Acids Res*, 1992. 20(15): p. 4061-7.
117. pierce, <http://www.piercenet.com>.
118. Bayer, E.A. and M. Wilchek, *Protein biotinylation*. *Methods Enzymol*, 1990. 184: p. 138-60.
119. Mercey, R., et al., *Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns*. *Arch Virol*, 2006. 151(11): p. 2197-214.
120. Hall, K.B. and J.K. Kranz, *Nitrocellulose filter binding for determination of dissociation constants*. *Methods Mol Biol*, 1999. 118: p. 105-14.
121. Czerwinski, J.D., S.C. Hovan, and D.P. Mascotti, *Quantitative nonisotopic nitrocellulose filter binding assays: bacterial manganese superoxide dismutase-DNA interactions*. *Anal Biochem*, 2005. 336(2): p. 300-4.
122. Wong, I. and T.M. Lohman, *A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): p. 5428-32.
123. 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.
124. Mayer, G., et al., *Light-induced formation of G-quadruplex DNA secondary structures*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2005. 6(11): p. 1966-70.
125. Walsh, R. and M.C. DeRosa, *Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 388(4): p. 732-5.
126. Anastassopoulou, J. and T. Theophanides, *Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. 42(1): p. 79-91.
127. Mergny, J.L., et al., *Kinetics of tetramolecular quadruplexes*. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(1): p. 81-94.

128. Proske, D., et al., *Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005. 69(4): p. 367-74.
129. Trujillo, C.A., et al., *Development of the anti-VEGF aptamer to a therapeutic agent for clinical ophthalmology*. Clin Ophthalmol, 2007. 1(4): p. 393-402.
130. Leblond-Francillard, M., M. Dreyfus, and F. Rougeon, *Isolation of DNA-protein complexes based on streptavidin and biotin interaction*. Eur J Biochem, 1987. 166(2): p. 351-5.
131. Paul, A., et al., *Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX*. Oligonucleotides, 2009. 19(3): p. 243-54.
132. Pileur, F., et al., *Selective inhibitory DNA aptamers of the human RNase H1*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(19): p. 5776-88.
133. 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.
134. 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.
135. Takemura, K., et al., *DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. 231(2): p. 204-14.
136. Yang, Q., et al., *DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(10): p. 5462-7.
137. Hasegawa, H., K. Sode, and K. Ikebukuro, *Selection of DNA aptamers against VEGF165 using a protein competitor and the aptamer blotting method*. Biotechnol Lett, 2008. 30(5): p. 829-34.
138. Arora, A., D.R. Nair, and S. Maiti, *Effect of flanking bases on quadruplex stability and Watson-Crick duplex competition*. FEBS J, 2009. 276(13): p. 3628-40.
139. Jing, N. and M.E. Hogan, *Structure-activity of tetrad-forming oligonucleotides as a potent anti-HIV therapeutic drug*. J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 34992-9.
140. 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.
141. 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.

142. Grand, C.L., et al., *Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(16): p. 6140-5.
143. Smirnov, I. and R.H. Shafer, *Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability*. Biochemistry, 2000. 39(6): p. 1462-8.
144. Guedin, A., P. Alberti, and J.L. Mergny, *Stability of intramolecular quadruplexes: sequence effects in the central loop*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(16): p. 5559-67.
145. Risitano, A. and K.R. Fox, *Stability of intramolecular DNA quadruplexes: comparison with DNA duplexes*. Biochemistry, 2003. 42(21): p. 6507-13.
146. Lauhon, C.T. and J.W. Szostak, *RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors*. J Am Chem Soc, 1995. 117(4): p. 1246-57.
147. Rachwal, P.A., T. Brown, and K.R. Fox, *Effect of G-tract length on the topology and stability of intramolecular DNA quadruplexes*. Biochemistry, 2007. 46(11): p. 3036-44.
148. Li, H., G. Yuan, and D. Du, *Investigation of formation, recognition, stabilization, and conversion of dimeric G-quadruplexes of HIV-1 integrase inhibitors by electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008. 19(4): p. 550-9.
149. Wang, J., et al., *Characterizing the interaction between aptamers and human IgE by use of surface plasmon resonance*. Anal Bioanal Chem, 2008. 390(4): p. 1059-65.
150. Dapic, V., et al., *Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications*. Biochemistry, 2002. 41(11): p. 3676-85.
151. Li, Y., C.R. Geyer, and D. Sen, *Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers*. Biochemistry, 1996. 35(21): p. 6911-22.
152. Jing, N., et al., *Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in Vitro*. J Biol Chem, 2000. 275(28): p. 21460-7.
153. Xiao, Z., et al., *Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection*. Chemistry, 2008. 14(6): p. 1769-75.
154. Zhou, J. and J.J. Rossi, *The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers*. Curr Top Med Chem, 2009. 9(12): p. 1144-57.
155. McNamara, J.O., 2nd, et al., *Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras*. Nat Biotechnol, 2006. 24(8): p. 1005-15.

## Anhang

### Sequenzen der Klone

Dargestellt sind jeweils die Sequenzen des randomisierten Bereichs der 18 selektierten Klone. Rot hervorgehoben sind die G-reichen Bereiche der fünf IL-6R-spezifischen Aptamere. Blau markiert sind die Klone, die neben der G-reichen Aptamere in Filterbindungsstudien untersucht wurden. Auf die Darstellung der konservierten Preimerregionen wurde verzichtet.

Klon13-1	GCAACCCCAGAGATCCTTACCGGGCCCGGCGAGCGGGCGTGTGGTGATTTACCTCTGAC
Klon13-2	GAGCTGTTGGACGAGTGTGACCCTAGCGATCGATCTCGTCTACTTGTTTAAGGGTTTCGG
Klon13-3	TTGTGTGCGTGCGATTCCCTCGGGGTGTGATCGGCGTGGTAGCAAGGGTATTAGGGTCGGA
Klon13-5	CTAGGTGATTTGGGGTGGGCGGGTGGGTCAACATAGGTAATTACGCGATTGACAGGCTTC
Klon13-6	CACGGTCAATCTTTAACCCGCGCTTAATGCGTGTCTCGGTCACTGCAGGTTTGAGTCTTG
Klon13-8	TGGTTACGCTTAGACGTGCATTCGTCTGGCAACACTGTAGGAGTCGTATGATCCGTACA
Klon13-11	GCATTGGGGGGGTGGGTGGGTGGGA
Klon13-15	TATGCGTCAATGGTTTTTAACAAGGCGATACGGCA
Klon13-15	CCTCAACGTACTCCCGGGGGTTGGGTGGGTGGGTATCGGGAGTAGGCCGCAACTGCCTG
Klon 13-18	TGGGCTATGGTCATATCGTTAGGTTAACATTGCGGGAGCGTCTCGCGGGCAATTAATGGG
Klon 13-19	GTACTTGAGCACTGGGGCAACCGTGATGTATGTTATAGTCACGTTACTTGGATCGCTTTG
Klon 13-21	TCATCATTGATCGACGGATCTACAGGAGTCTTCCGGGGGGTTAGTGTGGTCTG
Klon 13-23	GAGACGGGTGGGCTCCTTCGTGGCCGATACTGCGTTGACTGCACAGGAGcgAGAGCTAGTGGG
Klon 13-25	CCTAGGGACTGTGCGTCACAGTACATAGTCGATGTGTGCGTGGAAACATGCTAGTGTAGGGG
Klon 13-26	GTATGGTATTTCTGCCTCTTCGCGATTCTCTCGTTATGTTTGCGGTTCGCCGTGGTCTC
Klon 13-27	GAAGGACACGGTTTAGGGTGGGTGGGTGGGTAGCTACCGGTGCCTTGGTTGGGGGTGGG
Klon 13-28	GCCTTGTCCAGGCCTAGGGGAATACAGTATGTGGGCGGACGCATTGACGGTGGTGTATGTG
Klon 13-31	TGGCCCAGGGCTGGAACGTGTGTTACGGGAAATTGCCTACCGCTTAATTGTCCTTATAAC
Klon 13-32	TAAATCGGCGCCGGGTGGGCGGGTGGGT
	TAGTAGCGCTGAGTGGGTAAGGGTATCGTGGG

**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- 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
Chloramphenicol	T	45-46-63-42/43	36/37/39-45-53
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	11-23/24/25-39/23/24/25	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. Menge: 30 ml	K1B, M1B, R <sub>F</sub> 2
10043-35-3	Borsäure	Bestandteil von TBE-Puffer.	R <sub>E</sub> 1B R <sub>F</sub> 1B
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von DotBlots. Menge: 500 ml	R <sub>E</sub> 1B
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/ml wässrige Lösungen zur Färbung von Agarose- und PAA-Gelen (0,5 mg/ml Endkonzentration) Menge: 50 ml	M2
50-00-0	Formaldehyd	37%ige Lösung zur Silberfärbung von Proteinen. Menge :50 ml	K2

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn für die Vergabe dieses sehr spannenden und interessanten Themas, für die gute Betreuung und Unterstützung, für sein Vertrauen in mich, auch in Zeiten, an denen es schien, als würde nichts mehr gehen, bedanken.

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

Ein besonderer Dank gilt unseren Kooperationspartnern Herrn Professor Dr. Stefan Rose-John, Herrn Professor Dr. Jürgen Scheller, Herrn Professor Dr. Joachim Grötzinger und Frau Dr. Inken Lorenzen der Universität Kiel für die Bereitstellung der Proteine und Zellsysteme, die Grundlage dieser Arbeit waren, für ihr Interesse an der vorliegenden Arbeit und den stetigen Informationsaustausch.

Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Nicolas Piganeau für seine Betreuung und Unterstützung, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und guten Ratschläge, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Professor Dr. Günter Mayer für die freundliche Einladung nach Bonn und die kurzzeitige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die stetige Diskussionsbereitschaft, viele gute Ratschläge und sein Interesse an dieser Arbeit danken.

Bei Frau Dr. Cindy Meyer möchte ich mich für die gute und produktive Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt, die ständige Bereitschaft zur Diskussion, für die Hilfe beim Lösen ganz „schwerer“ mathematischer Aufgaben und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Chris Meier danke ich für die Bereitstellung des CD-Spektrometers und Marcus Schröder für die Einführung in die CD-Spektroskopie.

Bei Dr. Klaus Wiehler (SierraSensors GmbH) bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die Durchführung der SPR-Experimente.



## Danksagung

Eileen Magbanua und Katja Eydeler möchte ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der FCS-Messungen danken.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere Eileen, Katja und Christina danke ich für ihre Unterstützung, die Aufmunterung und motivierenden Zuspruch an nicht so guten Tagen.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden außerhalb des Labors für ihr Verständnis, moralische Unterstützung und Glauben an mich bedanken.

Zum Schluss gilt mein herzlichster und größter Dank meinen Eltern und meiner Schwester, für ihre aufopfernde, bedingungslose Liebe, ihr Vertrauen und Unterstützung über all die Jahre. Mit eurer Hilfe und Kraft habe ich auch diese Hürde geschafft.

Euch widme ich diese Arbeit.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (einschließlich elektronischer Medien und Online-Quellen) benutzt habe.

Diese Arbeit wurde zuvor an keiner anderen Hochschule oder Universität als Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. vorgelegt oder anderweitig publiziert.

Hamburg, den 25.03.2010

Tijana Živković