

Charakterisierung von RNA-Aptameren mit Spezifität für den humanen Interleukin-6-Rezeptor

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

An dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Katja Eydeler
aus Wedel

Hamburg, 2011

Die vorgelegte Arbeit wurde von Oktober 2007 bis März 2011 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn angefertigt.

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn

Herr Prof. Dr. Reinhard Bredehorst

Tag der Disputation: 20. Mai 2011

Für alle, die an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX
Abstract	XIII
Kurzfassung	XV
1. Einleitung	1
1.1. Zytokine	1
1.2. Das Zytokin Interleukin-6	1
1.3. Der humane Interleukin-6-Rezeptor-Komplex	3
1.4. Der IL-6-induzierte Signaltransduktionsweg	6
1.5. Zusammenhang zwischen IL-6 und Erkrankungen	7
1.6. Aptamere	8
1.7. G-Quadruplexe	10
1.8. Modifizierungen von Nukleinsäuren	12
1.9. Anwendungen von Aptameren in Therapie und Diagnostik	13
1.10. Das IL-6R-bindende Aptamer 16-3A	20
2. Zielsetzung	23
3. Material	24
3.1. Chemikalien	24
3.2. Puffer, Lösungen und Medien	24
3.3. Nukleotide und Radionukleotide	26
3.4. Enzyme	26
3.5. Längenstandards	26
3.6. Kommerziell erhältliche Kits	27
3.7. Antikörper	27
3.8. Wachstumsfaktoren und Proteine	27
3.9. Synthetische Oligonukleotide	28
3.10. Zelllinien	29
4. Methoden	30

4.1.	Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren	30
4.1.1.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	30
4.1.2.	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	31
4.1.3.	Detektion von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid	31
4.1.4.	Detektion von Nukleinsäuren durch UV-Shadowing	31
4.1.5.	Detektion von Nukleinsäuren durch Autoradiographie	32
4.1.6.	Visualisierung von Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren	32
4.1.7.	Diffusionselution von RNA aus Polyacrylamidgelen	32
4.1.8.	Phenol-Chloroform-Extraktion	33
4.1.9.	Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren	33
4.1.10.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren	33
4.1.11.	Reinigung mittels BioSpin® P6 Säulen	34
4.2.	Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren	34
4.2.1.	Hybridisierung von Nukleinsäuren	34
4.2.2.	<i>In vitro</i> T7-Transkription	34
4.2.3.	T7-Transkription mit Einbau modifizierter Nukleotide	35
4.2.4.	GTPS-T7-Transkription zur Fluoreszenzmarkierung von RNA	36
4.2.5.	Dephosphorylierung von Nukleinsäuren	36
4.2.6.	Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA	37
4.2.7.	Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszähler	37
4.3.	Proteinbiochemische Methoden	38
4.3.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.3.2.	Nachweis von Proteinen mittels <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	38
4.3.3.	Western-Blot	39
4.4.	Zellbiologische Techniken	40
4.4.1.	Kultivierung von BAF/3-Zellen	40
4.4.2.	Kryokonservierung von BAF/3-Zellen	40
4.4.3.	Durchflusszytometrie	40
4.4.3.1.	Nachweis von Membranproteinen bei BAF/3-Zellen	41
4.4.3.2.	<i>Shedding</i> des IL-6-Rezeptors	41
4.4.3.3.	Analyse der Aptamerbindung und der Internalisierung	42
4.4.4.	Fluoreszenzmikroskopie	42
4.4.4.1.	Bindung des Aptamers an den nativen IL-6-Rezeptor und Rezeptor-vermittelte Internalisierung	43
4.4.4.2.	Visualisierung von Proteinen	43
4.4.5.	Proliferationsassay	44
4.4.6.	Transfektion von BAF/3-Zellen	44
4.4.7.	Rezeptor-vermittelte Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären zur Verminderung der Produktion von mSTAT3 und mSTAT5	45

4.5.	Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktion	45
4.5.1.	Filterbindungsstudien	45
4.5.2.	Sekundärstrukturvorhersage von Nukleinsäuren	46
4.5.3.	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	46
4.5.3.1.	Belegung des Sensor-Chips	47
4.5.3.2.	Messung der Aptamer-Protein-Interaktion	48
4.5.4.	Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären mittels Dicer	48
5.	Ergebnisse	49
5.1.	Mutationsanalyse der Loopregionen	49
5.1.1.	Filterbindungsstudien	52
5.1.2.	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	58
5.1.2.1.	Analyse der Bindung des Aptamers 16-3A an Hyper-IL-6 mittels SPR	60
5.1.2.2.	Analyse von Punktvarianten des Aptamers 16-3A mittels SPR	62
5.2.	2'F-Modifikationen des Aptamers	65
5.3.	Analyse der Stabilität des Aptamers in Zellkulturmedium	67
5.4.	Nachweis des IL-6-Rezeptors und gp130 auf BAF/3-Zellen	69
5.5.	Bindung des Aptamers 16-3A an den nativen IL-6-Rezeptor	71
5.6.	Internalisierung des IL-6R-spezifischen Aptamers 16-3A	74
5.6.1.	Durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis einer Internalisierung des Aptamers 16-3A in BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen	74
5.6.2.	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Internalisierung	76
5.6.3.	Abhängigkeit der Internalisierung von IL-6	79
5.7.	Auswirkungen der Aptamerbindung auf den IL-6R Signalweg	80
5.7.1.	Phosphorylierung von STAT3 nach IL-6-Stimulation	80
5.7.2.	Analyse möglicher zytotoxischer Einflüsse nach Aptamerbindung	82
5.8.	Bindung an die D3-Domäne	83
5.9.	Studien der Kompetition zwischen dem Aptamer 16-3A und einem anti-IL-6-Rezeptor Antikörper um die Bindung an den IL-6R	84
5.10.	Verwendung der Aptamere als Delivery-Vehikel von siRNAs zur Zelltyp-spezifischen Aufnahme ins Zellinnere	85
5.10.1.	Konstruktion von Aptamer-siRNA-Chimären	85
5.10.2.	Sekundärstrukturanalyse mittels mfold	87
5.10.3.	Filterbindungsstudien zur Analyse der Interaktion zwischen den Aptamer-siRNA-Chimären und Hyper-IL-6	88
5.10.4.	Fluoreszenz-Markierung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3	93
5.10.5.	Bindung der Aptamer-siRNA-Chimären an den nativen IL-6-R auf BAF/3-Zellen	94
5.10.6.	Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären durch rekombinanten humanen Dicer	96

5.10.7. Analyse der Herabregulation von pSTAT3 nach Transfektion von BAF/3-Zellen mit den Aptamer-siRNA-Chimären	97
6. Diskussion	101
7. Ausblick	125
Literaturverzeichnis	127
Anhang	136
GHS-Verordnung	136
Sicherheitshinweise für Gefahrstoffe	137
Gefahrstoffinformationen	138
Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I & II	141
Danksagung	142
Selbstständigkeitserklärung	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Biologische Funktionen von Interleukin-6.	2
Abbildung 1-2: Kristallstruktur des humanen Interleukin-6.	2
Abbildung 1-3: Die klassische Aktivierung des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes.	4
Abbildung 1-4: Trans-Signaling des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes.	5
Abbildung 1-5: Aktivierung der Signalkaskade durch IL-6.	6
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.	9
Abbildung 1-7: G-Quadruplex-Strukturen.	11
Abbildung 1-8: Aptamer-Modifikationen zur Steigerung der Stabilität.	13
Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz nach Internalisierung von Aptamer-siRNA-Chimären.	16
Abbildung 1-10: Aptamer-vermittelte Zell-spezifische Internalisierung.	18
Abbildung 1-11: Anwendung von Aptameren für molekulares in vivo Imaging.	19
Abbildung 1-12: Sequenzen der RNA-Aptamere spezifisch für den sIL-6R.	20
Abbildung 1-13: Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.	21
Abbildung 1-14: Mögliche G-Quadruplex-Struktur des Aptamers 16-3A.	22
Abbildung 4-1 Oberflächenplasmonresonanz.	47
Abbildung 5-1: Hybridisierung des T7-Promotors und in vitro T7-Transkription.	50
Abbildung 5-2: Kontrollgel der Hybridisierung des T7-Oligonukleotides für die Produktion der drei Varianten des Loops 1.	51
Abbildung 5-3: Kontrolle der präparierten Loopvarianten mittels denaturierender PAGE.	52
Abbildung 5-4: PAA-Kontrollgel der radioaktiven Markierung des RNA-Aptamers 16-3A und davon abgeleiteter Punktvarianten (G4A, A5U und G3U). SDS-PAA-Gel des Proteins Hyper-IL-6.	53
Abbildung 5-5: Analyse der Interaktion zwischen dem Protein Hyper-IL-6 und dem RNA-Aptamer 16-3A und drei davon abgeleiteten Varianten des Loops 1 (G4A, A5U und G3U) mittels Filterbindungsstudie.	54
Abbildung 5-6: Graphische Auswertung der analytischen Filterbindungsstudie zum Nachweis der Interaktion zwischen Aptamer 16-3A und der Varianten des Loops 1 (G4A, A5U und G3U).	54
Abbildung 5-7: Analyse der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und verschiedenen Punktvarianten der Loop 2-Region des Aptamers 16-3A (C8A, G10A, U11A und U9A) mittels Filterbindungsstudie.	55
Abbildung 5-8: Graphische Auswertung der Ergebnisse aus analytischen Filterbindungsstudien zum Nachweis der Interaktion zwischen dem Aptamer 16-3A und der Loopvarianten des Loops 2 (C8A, G10A, U11A und U9A).	56
Abbildung 5-9: Filterbindungsstudie für Mutationsanalysen im Loop 3 des Aptamer 16-3A (G17U, G15U, U14A und A16U).	57
Abbildung 5-10: Graphische Auswertung des Filterbindungstests der Loopvarianten 3.	57
Abbildung 5-11: Belegung des Amin-Sensor-Chips für Messungen am SPR.	59
Abbildung 5-12: SPR-Sensogramm der Assoziation und Dissoziation des Aptamers 16-3A an/von Hyper-IL-6.	60

Abbildung 5-13: SPR-Analyse der Interaktion zwischen dem durch T7-Transkription gewonnenen Aptamers 16-3A und Hyper-IL-6.	61
Abbildung 5-14: Bindungsanalyse der Interaktion zwischen den Punktvarianten aus Loop 3 und Hyper-IL-6 mittels SPR.	63
Abbildung 5-15: Filterbindungsstudie des 2'F-modifizierten Aptamers.	65
Abbildung 5-16: Graphische Auswertung der Filterbindungsstudien des Aptamers 16-3A_2'F-CTP.	66
Abbildung 5-17: Stabilitätstest des Aptamers 16-3A in Zellkulturmedium.	67
Abbildung 5-18: Stabilitätstest des 2'F-CTP-modifizierten Aptamers 16-3A in serumhaltigen Medium.	68
Abbildung 5-19: Stabilitätstest des mit Hyper-IL-6 inkubierten Aptamers in Zellkulturmedium.	68
Abbildung 5-20: Nachweis des IL-6R auf BAF/3 Zellen mittels Durchflusszytometrie.	69
Abbildung 5-21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Membranproteine gp130 und hIL-6R auf BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen.	70
Abbildung 5-22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis des Proteins gp130 auf BAF/3_gp130-Zellen.	71
Abbildung 5-23: Nachweis der Aptamer-Bindung an IL-6R tragende BAF/3-Zellen am Fluoreszenzmikroskop.	72
Abbildung 5-24: Analyse der Aptamer-Bindung an den nativen IL-6R mittels Durchflusszytometrie.	72
Abbildung 5-25: Konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers 16-3A an den nativen IL-6R auf BAF/3-Zellen.	73
Abbildung 5-26: Analyse der Aptamer-Internalisierung mittels Durchflusszytometrie.	75
Abbildung 5-27: Nachweis der Spezifität der Internalisierung mittels Durchflusszytometer.	76
Abbildung 5-28: Nachweis der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.	77
Abbildung 5-29: Trypsinierung von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen nach Internalisierung des Aptamers.	77
Abbildung 5-30: Konfokale Analyse der Aptamer-Internalisierung mittels LSM.	78
Abbildung 5-31: Analyse der Abhängigkeit der Aptamer-Internalisierung von IL-6.	79
Abbildung 5-32: Analyse der Stimulation von mSTAT3 durch das Aptamer mittels Western-Blot.	80
Abbildung 5-33: Proliferations-Test für die Stimulation von STAT3:	81
Abbildung 5-34: Zytotoxizitätstest.	82
Abbildung 5-35: Analyse der Bindung des Aptamers 16-3A an die D3-Domäne von hIL-6R mittels Filterbindungsstudie.	83
Abbildung 5-36: Durchflusszytometrische Analyse der Konkurrenz zwischen dem Aptamer 16-3A und einem hIL-6R-spezifischen Antikörper um die Bindung an BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen.	85
Abbildung 5-37: Sekundärstrukturanalyse des Aptamers 16-3A und der Aptamer-siRNA-Chimäre.	87
Abbildung 5-38: 10%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel zur Kontrolle der siRNA-Aptamer-Chimäre.	88
Abbildung 5-39: Kontrolle der radioaktiv markierten Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 mittels denaturierender PAGE.	89
Abbildung 5-40: Kontrolle der radioaktiv markierten Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT5 mittels denaturierender PAGE.	89
Abbildung 5-41: Filterbindungsstudie Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.	90

<i>Abbildung 5-42: Auswertung der Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 und Hyper-IL-6.</i>	91
<i>Abbildung 5-43: Analyse der Bindung mittels radioaktiven Filterbindungstests der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT5.</i>	92
<i>Abbildung 5-44: Auswertung der Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT5 an Hyper-IL-6.</i>	92
<i>Abbildung 5-45: Kontrollgel Fluoreszenz markierter Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.</i>	94
<i>Abbildung 5-46: Nachweis der Bindung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3 an den membranständigen IL-6R mittels Durchflusszytometer.</i>	95
<i>Abbildung 5-47: Analyse der Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 durch hDicer.</i>	96
<i>Abbildung 5-48: Optimierung der Transfektion von BAF/3_gp130_hIL6R Zellen mit einer anti-mSTAT3-siRNA und Bestimmung der Transfektionseffizienz.</i>	98
<i>Abbildung 5-49: Analyse der Produktion von mSTAT5 nach Transfektion von hIL-6R tragenden BAF/3 Zellen mit den Aptamer-siRNA-Chimäre mittels Western-Blot.</i>	99
<i>Abbildung 5-50: Analyse der Expression von phosphoryliertem mSTAT3 in hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen nach Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.</i>	100
<i>Abbildung 6-1: Postulierte G-Quadruplex-Struktur des Aptamers 16-3A und Auswirkungen einzelner Basenaustausche auf die Bindung des Aptamers zu HIL-6.</i>	108
<i>Abbildung 6-2: Mögliche Prozesse nach Internalisierung des Aptamers 16-3A.</i>	124

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1: Aptamere mit einer G-Quadruplex-Struktur.</i>	12
<i>Tabelle 1-2: Therapeutisch wirksame Aptamere in klinischen Studien.</i>	14
<i>Tabelle 1-3: Aptamere als Delivery-Vehikel.</i>	19
<i>Tabelle 3-1: Puffer und Lösungen für die Nukleinsäureanalytik.</i>	24
<i>Tabelle 3-2: Puffer und Lösungen für die Protein-Analytik.</i>	25
<i>Tabelle 3-3: Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten.</i>	26
<i>Tabelle 3-4: Verwendete Antikörper.</i>	27
<i>Tabelle 3-5: RNA-Oligonukleotide.</i>	28
<i>Tabelle 3-6: DNA-Oligonukleotide.</i>	28
<i>Tabelle 4-1: Zusammensetzung denaturierender Polyacrylamidgele.</i>	30
<i>Tabelle 4-2: Hybridisierung mit T7-Primer.</i>	34
<i>Tabelle 4-3: Reaktionsansatz einer T7-Transkription.</i>	35
<i>Tabelle 4-4: T7-Transkription mit modifizierten Nukleotiden.</i>	35
<i>Tabelle 4-5: Fluoreszenzmarkierung GTPS-geprimter RNA.</i>	36
<i>Tabelle 4-6: Dephosphorylierung von RNA-Fragmenten.</i>	36
<i>Tabelle 4-7: Radioaktive Endmarkierung von RNA.</i>	37
<i>Tabelle 4-8: Zusammensetzung des Sammelgels.</i>	38
<i>Tabelle 4-9: Zusammensetzung des Trenngels.</i>	38
<i>Tabelle 4-10: Antikörper im Western-Blot.</i>	39
<i>Tabelle 4-11: Einstellungen am LSM.</i>	42
<i>Tabelle 4-12: Pipettierschema Dicing-Assay.</i>	48
<i>Tabelle 5-1: Überblick der untersuchten Punktvarianten in den postulierten Loopregionen des Aptamers 16-3A.</i>	49
<i>Tabelle 5-2: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalysen aus radioaktiven Filterbindungsstudien.</i>	58
<i>Tabelle 5-3: Affinität und Kinetik der Bindung des Aptamers 16-3A an Hyper-IL-6 mittels SPR-Analyse.</i>	62
<i>Tabelle 5-4: Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels SPR</i>	64
<i>Tabelle 5-5: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien für das sIL-6R-spezifische Aptamer 16-3A, die 2'F-modifizierte Variante 16-3A_2'F-CTP und der Punktvariante 16-3A_G17U_2'F-CTP.</i>	66
<i>Tabelle 5-6: Übersicht der Aptamer-siRNA-Chimären.</i>	86
<i>Tabelle 5-7: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3.</i>	91
<i>Tabelle 5-8: Anteil maximaler Bindung und ermittelter K_d-Werte der Chimäre für mSTAT5 aus Filterbindungsstudien.</i>	93
<i>Tabelle 7-1: Gefahrstoffinformationen</i>	138
<i>Tabelle 7-2: KMR-Substanzen</i>	141

Abkürzungen

2'F-CTP	2-Fluoro-Desoxy-Cytidintriphosphat
2'F-UTP	2-Fluoro-Desoxy-Uridintriphosphat
A	Adenin
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
Ak	Antikörper
AMD	Altersbedingte Makulardegeneration
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAF/3	<i>bone marrow-derived pro-B-cell line</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CBD	Zytokin-bindende Domäne (<i>cytokine binding domain</i>)
CD	Circulardichroismus
cpm	Zählimpulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA (<i>double stranded RNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEF2	<i>eucaryotic elongation factor 2</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

EpoR	<i>erythropoietin receptor</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward-scatter</i>)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSFR	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	growth factor receptor-bound protein
GTPS	Guanin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
HIL-6	Hyper-IL-6
hIL-6R	humaner Interleukin-6-Rezeptor
IL-6	Interleukin 6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
JAK	Janus-Kinase
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
M	Molar
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinase
MEK	<i>mitogen-activated/ extracellular signal-regulated protein kinase</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
mSTAT	<i>murines signal transducer and activator of transcription</i>
Mw	Molare Masse (<i>molecular weight</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTPs	Nukleosid-5'-triphosphate

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNK	Polynukleotidkinase
PSMA	<i>prostate specific membrane antigen</i>
pSTAT	phosphoryliertes <i>signal transducer and activator of transcription</i>
PTK7	Protein Tyrosin Kinase 7
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-kappaB</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side-scatter</i>)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
TACE	<i>tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumenanteil (<i>volume-volume percentage</i>)
w/v	Massenanteil (<i>weight-volume percentage</i>)

Abstract

Cytokines play an important role in the regulation of numerous cellular functions. Their binding to specific receptor complexes triggers signal transduction pathways which affect the growth and differentiation of their target cells [1]. Interleukin-6 (IL-6) enters a key switch position in the interaction of the innate and adaptive immune system [2]. The cytokine exerts its function after binding to an IL-6 receptor complex. This consists of the IL-6 receptor (IL-6R) and two units of the glycoprotein gp130 [3]. The receptor complex is subject to constant recycling processes, where the endocytosis is accelerated by the binding of IL-6 [4].

The application of an *in vitro* evolutionary process enabled the isolation of RNA-aptamers with specificity for the soluble IL-6R. The Aptamers were shortened to the minimal binding motif and the G-rich Aptamer 16-3A was identified. This 19 nt long variant adopts the structure motif of a guanine quadruplex [5, 6].

The present work describes the characterization of the aptamer 16-3A with respect to the bases essential for binding between the Aptamer and the target protein. Further the possible use of the aptamer as a vehicle for the cell-specific transport of siRNAs was investigated.

It turned out that five of the eleven bases analyzed were as essential for affinity as measured by filter binding assays and surface plasmon resonance (SPR). A dissociation constant of 9 nM for SPR-measurements and of 67 nM for filter binding studies was obtained for the RNA-Aptamer 16-3A. The introduction of a 2'-F cytosine at position 8 however did not lead to the loss of affinity but could increase the stability of the aptamer in serum-containing medium only slightly.

By flow cytometry and confocal fluorescence microscopy the binding of the aptamer 16-3A to the membrane-bound IL-6R was determined. Furthermore the specific receptor-mediated internalization of the aptamer could be detected. It was shown that the cellular uptake of the aptamer was not dependent on IL-6, and neither pro- nor anti-proliferative effects on IL-6R bearing cells occurred after aptamer-binding or -internalization

Covalent linkage of the aptamer with siRNAs did not affect the affinity between the aptamer and the IL-6R, as it was shown by filter binding studies and flow cytometry. Additionally, these chimeras were processed by recombinant human Dicer as shown by *in vitro* studies. A down-regulation of target genes of the chimeras, murine STAT3 and murine STAT5 after

transfection or after receptor-specific uptake was, however, not be detected by Western-Blot analysis.

Increased IL-6 concentrations and a dysregulation of the soluble forms of the receptor complex play a role in various diseases. A possible therapeutic application is the inhibition of the IL-6 mediated signaling pathway. In prospective studies it remains to be determined whether the stability of the aptamer 16-3A against ribonucleases can be increased by further post-selective modifications without loss of affinity. This would approve a systemic application of the aptamer in conjugation with ligands such as toxins or therapeutically effective siRNAs. Also, a marking effect of the aptamer for the *in vivo* detection of soluble or membrane-bound IL-6 receptor could be helpful.

Kurzfassung

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation zahlreicher Zellfunktionen. Ihre Bindung an spezifische Rezeptorkomplexe löst intrazelluläre Signaltransduktionswege aus, die das Wachstum und die Differenzierung ihrer Zielzellen beeinflussen [1]. So nimmt Interleukin-6 (IL-6) eine Schlüsselstellung bei der Wechselwirkung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems ein [2]. Seine Funktion als Botenstoff übt IL-6 durch die Bindung an einen IL-6-Rezeptorkomplex aus. Dieser besteht aus dem eigentlichen IL-6-Rezeptor (IL-6R) und zwei Einheiten des Glykoproteins gp130 [3]. Der Rezeptorkomplex unterliegt ständigen Recycling-Prozessen, wobei die Endozytose durch die Bindung von IL-6 beschleunigt wird [4].

Mittels eines *in vitro* Evolutionsprozesses konnten RNA-Aptamere mit Spezifität für den löslichen IL-6R isoliert und auf das minimale Bindemotiv reduziert werden. Somit konnte das hochspezifische Aptamer 16-3A (19 nt) generiert werden, welches das tertiäre Strukturmotiv eines G-Quadruplexes annimmt [5, 6].

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung des Aptamers 16-3A im Hinblick auf die für die Bindung essentiellen Basen und die Möglichkeit, das Aptamer als Vehikel für den Zell-spezifischen Transport zu nutzen.

Über Filterbindungsstudien und Messung der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) konnte eine Dissoziationskonstante von 67 nM (Filterbindungsstudie) bzw. 9 nM (SPR) für das Aptamer 16-3A ermittelt werden. Anhand von Mutationsanalysen wurde der Einfluss einzelner Basen auf die Bindung zwischen dem Aptamer 16-3A und dem IL-6R untersucht. Dabei erwiesen sich fünf der elf analysierten Basen als essentiell. Das Einführen eines 2'-F-Cytosins führte hingegen nicht zum Verlust der Affinität, konnte die Stabilität des Aptamers in Serum-enthaltenem Medium aber nur geringfügig steigern.

Mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte nicht nur die Bindung des Aptamers 16-3A an den membranständigen IL-6R, sondern auch die Rezeptor-vermittelte spezifische Internalisierung des Aptamers nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Aufnahme des Aptamers nicht von IL-6 abhängig ist und weder einen pro- noch anti-proliferierenden Effekt auf IL-6R-tragende Zellen ausübt.

Eine kovalente Verknüpfung des Aptamers mit siRNAs führte zu keiner Beeinträchtigung der Affinität zwischen dem Aptamer und dem IL-6R, wie anhand von Filterbindungsstudien und Durchflusszytometrie gezeigt wurde. Des Weiteren konnten diese Chimären in *in vitro*

Studien durch rekombinanten Dicer prozessiert werden. Der Nachweis einer Herabregulierung der Zielgene der Chimären, murines STAT3 und murines STAT5 nach Transfektion bzw. nach erfolgter Rezeptor-spezifischer Aufnahme, war hingegen mittels einer Western-Blot-Analyse nicht möglich.

Erhöhte IL-6 Konzentrationen bzw. eine Dysregulation der löslichen Formen des Rezeptorkomplexes spielen bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle. Eine mögliche therapeutische Anwendung bietet die Inhibierung des IL-6 vermittelten Signalweges. In folgenden Studien bleibt zu klären, ob die Stabilität des Aptamers 16-3A gegenüber Ribonukleasen durch weitere postselektive Modifikationen gesteigert werden kann. Dies würde eine systemische Anwendung des Aptamers in Konjugation mit Liganden wie Toxinen oder therapeutisch wirksamen siRNAs ermöglichen. Auch eine markierende Wirkung des Aptamers für die *in vivo* Detektion des löslichen oder membranständigen IL-6-Rezeptors könnte so erreicht werden.

1. Einleitung

1.1. Zytokine

Zytokine sind lösliche Polypeptide, die eine wichtige Rolle bei der Regulation zahlreicher Zellfunktionen ausüben und primär von Zellen des Immunsystems produziert und sekretiert werden. Sie steuern dabei Wachstum, Differenzierung und Effektorfunktionen [1] und sind bereits in Konzentrationen im Piko- bis Nanogramm-Bereich wirksam [7]. Zu den Zytokinen werden Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Koloniestimulierende Faktoren gezählt [8]. Die Produktion von Zytokinen, die meist ein Molekulargewicht von weniger als 30 kDa haben, ist streng reguliert und wird nur bei Bedarf initiiert. Nach Sekretion besitzen Zytokine nur eine geringe Reichweite und Halbwertszeit. Ein gemeinsames Merkmal von Zytokinen ist ihre Bindung an spezifische Rezeptorkomplexe, wodurch intrazelluläre Signaltransduktionswege ausgelöst werden [9].

1.2. Das Zytokin Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionales Zytokin, welches von verschiedenen Zelltypen, wie stimulierten Monozyten, B- und T-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten, produziert wird [10]. Dabei wird IL-6 als inaktives Propeptid (212 AS) synthetisiert, von dem das aktive Protein aus 184 Aminosäuren abgespalten wird. Über posttranslationale Modifikationen (Glykosylierungen, Phosphorylierungen) werden unterschiedliche Isoformen erzeugt, dessen spezifische biologische Funktionen noch nicht aufgeklärt sind [11]. IL-6 besitzt ein weites Wirkungsspektrum und wird sowohl als pro-inflammatorisches, als auch als anti-inflammatorisches Zytokin gehandelt [12]. Dabei spielt es eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von B- und T-Zellen, der Hämatopoese und der Induktion von Akute-Phase-Proteinen bei Hepatozyten [11]. Somit nimmt es eine Schlüsselstellung bei den Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen und des erworbenen Immunsystems bei Entzündungsreaktionen ein [2] (Abbildung 1-1).

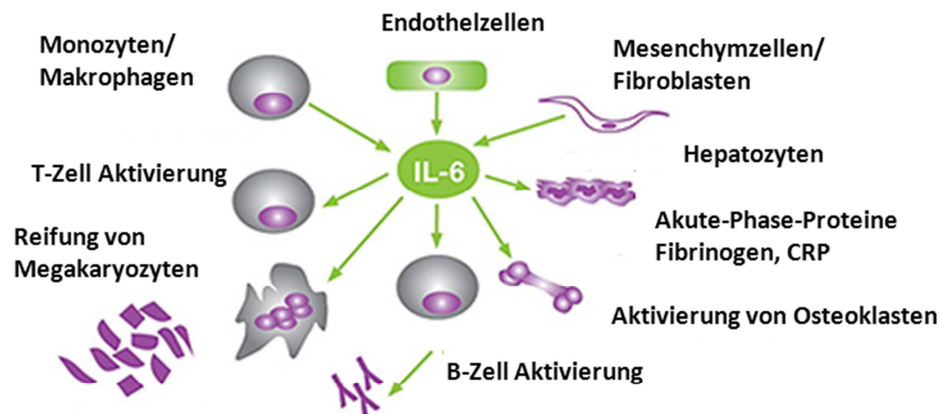


Abbildung 1-1: Biologische Funktionen von Interleukin-6.

Interleukin-6 (IL-6) wird hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert, die durch eingedrungene Erreger stimuliert werden. Die Funktionen des IL-6 sind vielfältig. So werden beispielsweise B- und T-Zellen zur Proliferation oder Makrophagen und Megakaryozyten zur Differenzierung angeregt. Bei Hepatozyten wird die Akute-Phase-Reaktion induziert. Modifiziert nach [13].

Die Produktion von IL-6 kann z. B. durch virale Nukleinsäuren, bakterielle Lipopolysaccharide oder durch andere Zytokine initiiert werden [14, 15]. IL-6 gehört wie Interleukin-11, Interleukin-27, wie auch LIF (*leukemia inhibitory factor*) und Oncostatin-M zur Familie der Interleukin-6-Typ Zytokine, die ihre Zielzellen durch Bindung an einen Rezeptor assoziiert mit dem Glykoprotein gp130 aktivieren [16]. Weiterhin wird IL-6 zur Gruppe der 4-Helix-Bündel Proteine gezählt, die durch vier antiparallele α -Helices charakterisiert sind [17]. Die Struktur des IL-6, sowie die Bindungsstellen für den hIL-6-Rezeptor-Komplex sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

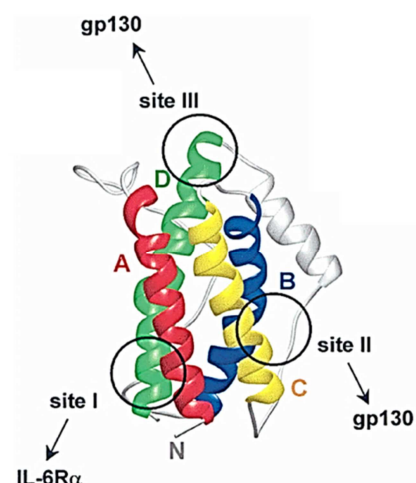


Abbildung 1-2: Kristallstruktur des humanen Interleukin-6.

Das humane IL-6 gehört zur Gruppe der 4-Helix-Bündel Proteine, welche durch eine antiparallele Anordnung von vier α -Helices (A-D) gekennzeichnet ist. Die drei Bindungsstellen zum humanen IL-6-Rezeptor sind mit *site I* (IL6-R α -Kette) und *site II & III* je gp130 markiert [18].

1.3. Der humane Interleukin-6-Rezeptor-Komplex

Interleukin-6 übt seine Funktion als Botenstoff durch seine spezifische Bindung an den Interleukin-6-Rezeptor aus. Dieser ist ein Protein-Komplex bestehend aus zwei Polypeptidketten, dem eigentlichen Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R, α -Kette) und dem Glykoprotein gp130 (gp130, β -Kette) [3]. Beide Polypeptidketten setzen sich aus zahlreichen Domänen zusammen und sind durch eine N-terminale extrazelluläre Region, eine kurze Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Region gekennzeichnet [9, 19-21]. Der auf Zellen präsentierte reife IL-6R (449 AS) besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa, was auf zahlreiche Glykosylierungen zurückzuführen ist, und wird aus einem Vorläuferprotein (468 AS) prozessiert. Die extrazelluläre Region (339 AS) setzt sich aus der Immunglobulin-ähnlichen Domäne D1 und den Zytokin-bindenden Domänen (CBD) D2 & D3 zusammen. Dabei stärkt die Domäne D1 die Stabilität des Rezeptors [22]. Die Transmembranregion (28 AS) durchspannt die Zellmembran und geht im Zytosol in die zytoplasmatische Domäne (82 AS) über [21].

Das für die Signaltransduktion verantwortliche gp130 besteht aus 918 AS [23] und ist wie auch die α -Kette N-terminal aus drei Domänen D1-D3 aufgebaut, welche die Bindung zum IL-6R vermitteln. Zusätzlich besitzt die β -Kette drei Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen (D4-D6). Diese sind für die Kopplung von Ligandenbindung und Signalleitung ins Zellinnere von Bedeutung und beinhalten konservierte Cystein-Reste sowie ein WSXWS-Motiv [16]. Das Glykoprotein gp130 besitzt ein Molekulargewicht von 130 kDa.

Beim klassischen IL-6-Signaling führt die IL-6-Bindung an der α -Kette zu einer Komplexbildung aus dem IL-6R und zwei gp130-Molekülen, welche über ihre zytoplasmatischen Domänen die Signaltansduktion induzieren (Abbildung 1-3).

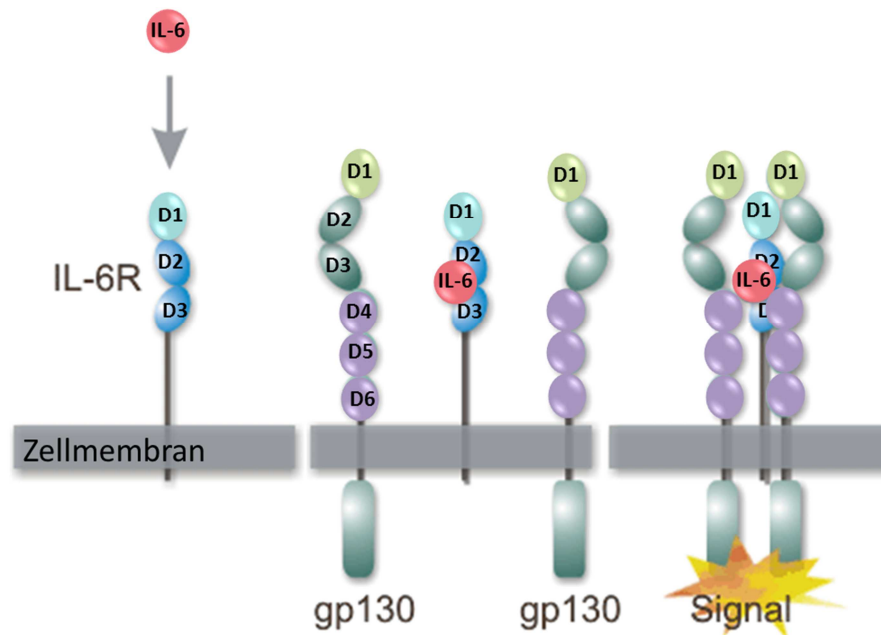


Abbildung 1-3: Die klassische Aktivierung des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes.

Der humane Interleukin6-Rezeptor-Komplex setzt sich aus den Polypeptiden hIL-6R und einem Homodimer von gp130 zusammen. Beim klassischen IL-6-Signaling bindet IL-6 an den IL-6R (α -Kette). Dies induziert eine Komplexbildung aus einem IL-6, einem IL-6R und zwei Molekülen des Glykoproteins gp130, welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Modifiziert nach [24].

Im Gegensatz zum IL-6R wird gp130 von nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert [23]. Innerhalb des zytoplasmatischen Anteils von gp130 gibt es als Box1, Box2 und Box3 bezeichnete, hochkonservierte Bereiche, die auch in anderen Zytokinrezeptoren wie G-CSFR (*granulocyte colony-stimulating factor*), IL-2 (Interleukin-2), IL-3 (Interleukin-3) und EpoR (*erythropoietin receptor*) zu finden sind [18].

Die Möglichkeit des klassischen IL-6-Signalings ist auf wenige Zelltypen beschränkt. Es existiert jedoch ein als *Trans-Signaling* benannter alternativer Mechanismus, bei dem über eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) Zellen ohne membranständigen IL-6-Rezeptor mittels IL-6 stimuliert werden können (Abbildung 1-4). Dabei wird die lösliche Form des Rezeptors über eine als *Shedding* bezeichnete limitierte Proteolyse oder über alternatives Spleißen erzeugt [25, 26], wobei die Entstehung des sIL-6R über eine alternativ gespleißte mRNA nur eine untergeordnete Rolle spielt.

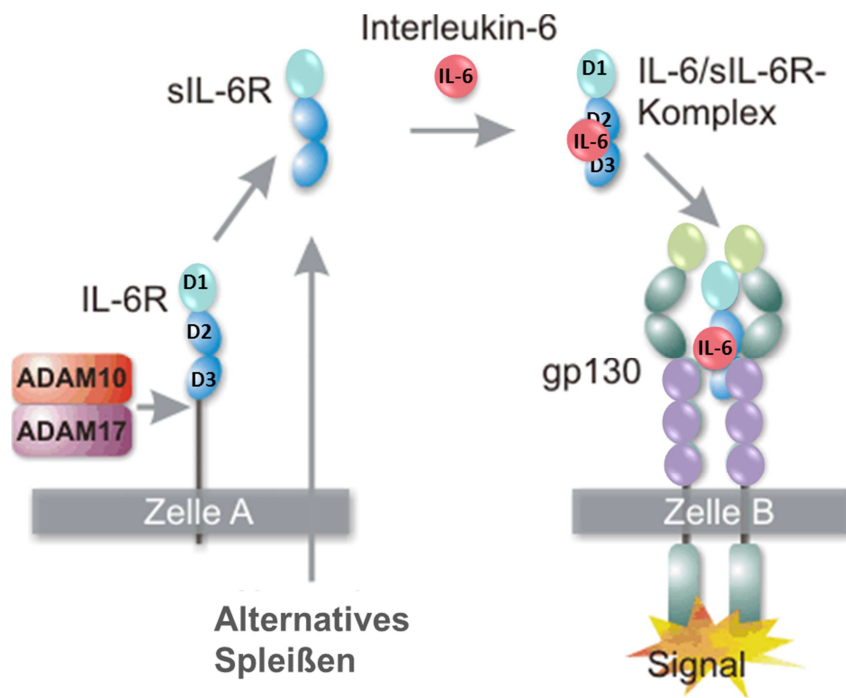


Abbildung 1-4: Trans-Signaling des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes.

Die lösliche Form des IL-6 Rezeptors (sIL-6R) wird durch alternatives Spleißen oder über limitierte Proteolyse generiert (*Shedding*) und kann nach Bindung von IL-6 Zellen stimulieren, die lediglich gp130 präsentieren. Für das *Shedding* des membranständigen IL-6R sind die Proteasen ADAM10 bzw. 17 verantwortlich. Modifiziert nach [24].

Beim *Shedding* spalten die G-Protein-gekoppelten membranständigen Metalloproteasen ADAM10 bzw. 17 (*a disintegrin and metalloproteinase*) spezifisch in einer Region zwischen der Domäne D3 und der Transmembran-Domäne [27]. Hauptproduzenten des löslichen IL-6R sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten [28]. Der membranständige IL-6R bindet seinen Liganden IL-6 mit einer vergleichbaren Affinität wie der sIL-6R [7]. Die Dissoziationskonstante wurde für beide Formen des Rezeptors mit $K_d \sim 1 \text{ nM}$ bestimmt.

Die Ligandenbindung löst nicht nur eine Signalkaskade aus (Abbildung 1-5), sondern induziert die Internalisierung des IL-6R [4]. Durch die Verminderung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche kann auf diese Weise einer Überstimulation durch IL-6 entgegengewirkt werden. Bei der Internalisierung übernehmen die zytoplasmatischen Domänen des gp130 wichtige Funktionen [29]. Auch ohne die Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex findet eine kontinuierliche Internalisierung des IL-6R statt. In diesem Fall, wird der Rezeptor recycelt und wieder zur Zelloberfläche transportiert anstatt, wie nach Bindung von IL-6, in Lysosomen abgebaut zu werden.

1.4. Der IL-6-induzierte Signaltransduktionsweg

Das Zytokin Interleukin-6 besitzt ein weites Wirkungsspektrum und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen und der Immunantwort [11]. Die Bindung an den IL-6-Rezeptor induziert eine Signalkaskade, welche die Aktivierung von Zielgenen für u. a. Differenzierungs- und Proliferationsprozesse hervorruft. Dabei werden sowohl der JAK/STAT- als auch der MAPK-Signalweg angeregt (Abbildung 1-5) [18].

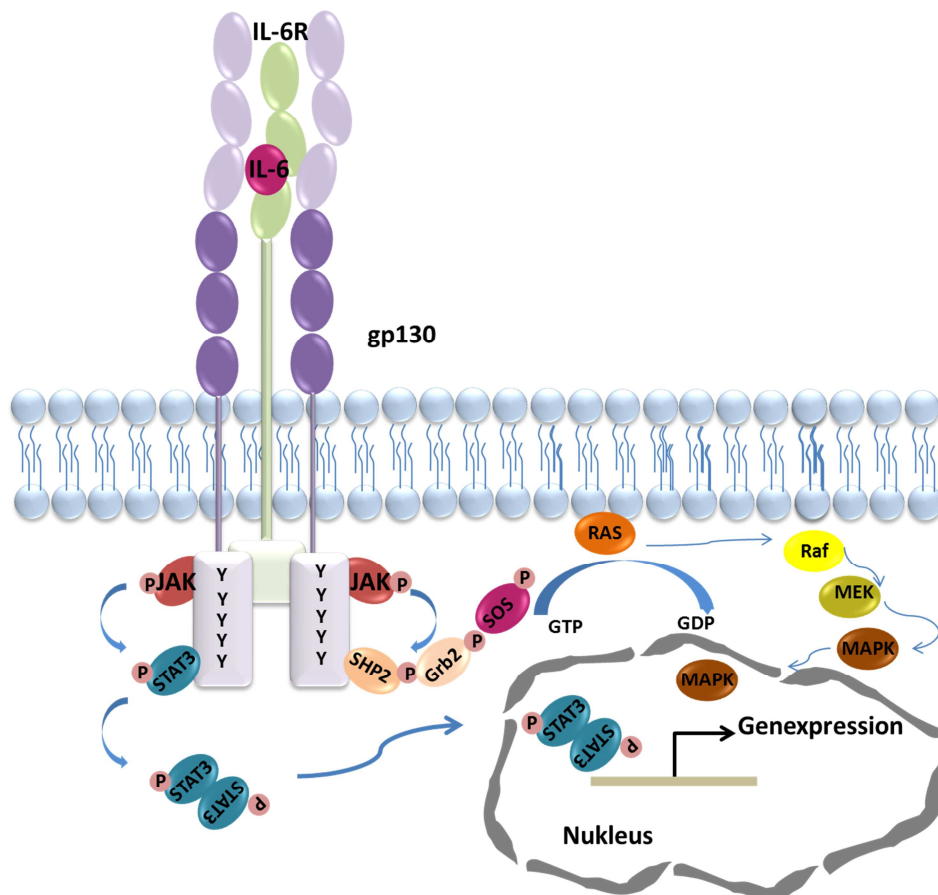


Abbildung 1-5: Aktivierung der Signalkaskade durch IL-6.

Durch die Bindung von IL-6 an die α -Kette des IL-6-Rezeptors (IL-6R) formiert sich ein Komplex aus IL-6, dem IL-6R und einem Homodimer von gp130. Dies induziert die Phosphorylierung von gp130 und die Aktivierung von Janus-Kinasen (JAK), wodurch zwei verschiedene Signaltransduktionswege initiiert werden können. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) führt zur dessen Dimerisierung und zum Transport in den Nukleus, wo Zielgene angesteuert und deren Expression induziert werden. Janus-Kinasen phosphorylieren ebenso SHP2 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase*), welche die Komplexbildung aus Grb2 (*growth-factor-receptor-bound-protein*) und SOS (*Son of Sevenless*) mit gp130 assoziieren. Die Komplexbildung aus SOS und gp130 ermöglicht die Aktivierung der Ras-Raf-MAPK-Kaskade. Ras (*Rat sarcoma*); Raf (*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*); MEK (*mitogen-activated/ extracellular regulated protein kinase*); MAPK (*mitogen-activated-protein kinase*).

Die Bindung des Komplexes aus IL-6 und dem IL-6R an ein Homodimer des gp130 führt zur Phosphorylierung des gp130 an Tyrosin 683. Hierfür ist JAK1 (Janus-Kinase) verantwortlich, wobei auch JAK2/3 mit gp130 assoziiert vorliegen und bei der weiteren Signalgebung involviert sind. Janus-Kinasen sind zytoplasmatische Tyrosinkinase, die konstitutiv mit

verschiedenen Zytokinrezeptoren assoziiert vorliegen. Zytokinrezeptoren besitzen selbst keine Enzymaktivität und werden hauptsächlich von Janus-Kinasen phosphoryliert. Diese phosphorylieren sich nach Aktivierung gegenseitig, was zur Induktion der weiteren Signalkaskade führt. Im Falle des IL-6 Rezeptors wird sowohl der STAT (*signal transducer and activator of transcription*) als auch der MAPK- (*mitogen-activated-protein kinase*) Signalweg aktiviert, deren Gleichgewicht fein reguliert ist. Die Phosphorylierung von STAT3 führt zu dessen Dimerisierung und Transport in den Zellkern [18]. Dort wirken STAT3-Dimere als Transkriptionsfaktoren und induzieren die Expression von Zielgenen, welche z. B. die Differenzierung und Proliferation der Zielzelle induziert. Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 wird mit zahlreichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. So kann die anhaltende Stimulierung der Genexpression und Produktion von z. B. Cyclin-D oder Bcl-2, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und RANTES zu einer abnormen Proliferationsrate, einer verstärkten Angiogenese, einer immunologischen Evasion und damit zur Metastasierung beitragen [30].

Die Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt über die Phosphorylierung von SHP2 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase*). Dieses Protein dient als Bindeglied zwischen gp130 und einem Komplex aus Grb2 (*growth-factor-receptor-bound-protein*) und SOS (*Son of Sevenless*), die nach Phosphorylierung zur Zellmembran rekrutiert und in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras (*Rat sarcoma*) gebracht werden. Die Aktivierung des membranassoziierten Proteins löst die Hydrolyse von GTP und die Aktivierung der Kinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*) aus, welche wiederum die Kinase MEK (*mitogen-activated/-extracellular regulated protein kinase*) phosphoryliert. Diese phosphoryliert schließlich MAP-Kinasen. Nachdem MAP-Kinasen an zwei Aminosäuren phosphoryliert wurden, wandern sie in den Nukleus ein, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit aktivieren können. Die Expression spezifischer Zielgene wird hierdurch ausgelöst [18].

1.5. Zusammenhang zwischen IL-6 und Erkrankungen

Interleukin-6 als pleiotropes Zytokin übt ein weites Spektrum von biologischen Funktionen aus. Dabei ist die Sekretion von IL-6 fein reguliert, und auch die Wirksamkeit des Zytokins wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert. Es existiert nicht nur eine lösliche Form des IL-6R [31], sondern auch von gp130 (sgp130). Dabei können die löslichen Formen der

Rezeptoren zirkulierendes IL-6 mit hoher Affinität binden und somit neutralisieren, da Komplexe aus sgp130/IL-6/sIL-6R nicht in der Lage sind, Zellen zu stimulieren und eine Signalkaskade auszulösen [7]. Die löslichen Rezeptoren unterdrücken somit die systemische Wirkung von IL-6 im Plasma. Erhöhte IL-6 Konzentrationen bzw. ein Ungleichgewicht an löslichen Rezeptoren (IL-6R & gp130) wurden mit verschiedenen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht. So spielt IL-6 bei der rheumatoiden Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen (z. B. Morbus Crohn), Blutkrebs, Prostatakrebs, Multipler Sklerose, Diabetes und Arteriosklerose eine wichtige Rolle [32, 33].

1.6. Aptamere

Unter dem Begriff Aptamer werden kurze Nukleinsäuren zusammengefasst, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung spezifisch und mit hoher Affinität Zielmoleküle binden können. Der Begriff Aptamer leitet sich dabei vom lateinischen Wort „*aptus*“ für passend und dem griechischen Wort „*meros*“ für Gebiet ab und wurde 1990 eingeführt [34]. Aptamere haben üblicherweise eine Länge von 20-70 Basen und binden ihre Zielmoleküle mit Bindungsstärken, die im Bereich von $K_d = 10^{-5}$ bis 10^{-12} M liegen. Als Targets kommen niedermolekulare Moleküle wie Farbstoffe und Antibiotika, aber auch Nukleinsäuren, Proteine und sogar ganze Mikroorganismen, wie etwa Viren, in Betracht. Die starken Interaktionen werden durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Basen-Stapelung sowie einer exakten Passgenauigkeit hervorgerufen [35].

Generiert werden Aptamere in einem *in vitro* Prozess, bei dem in zyklischen Wiederholungen eine Bibliothek von Nukleinsäuren mit dem Zielmolekül interagieren kann und sich spezifische Binder anreichern. In dieser als *Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) bezeichneten Methode [36, 37] werden üblicherweise Startbibliotheken mit einer Diversität von etwa 10^{15} Molekülen eingesetzt, sodass theoretisch für jedes existierende Zielmolekül Aptamere selektiert werden können. Dabei weisen die Bibliotheken einen randomisierten Bereich von 20-100 Basen auf, welcher gewöhnlich von zwei konstanten Regionen flankiert ist. Die Komplexität der Bibliothek ist jedoch durch die technische Synthese begrenzt und erreicht nicht die mathematisch mögliche Diversität [38]. Für die Anreicherung von bindenden Nukleinsäuren werden mehrere Schritte in einer Selektionsrunde benötigt. Zunächst wird der Ausgangspool mit dem Zielmolekül inkubiert. Zur Abtrennung von nicht bindenden Molekülen folgen mehrere Waschschr

Diese Separation ist von entscheidender Bedeutung. Dann werden die noch (am stärksten) gebundenen Nukleinsäuren vom Target eluiert. Die Moleküle mit Affinität zur Zielstruktur werden über enzymatische Reaktionen vervielfältigt, in die einzelsträngige Form umgewandelt und in eine erneute Selektionsrunde eingeführt. Der wiederholte Durchlauf einer Selektionsrunde führt nach 5-15 Selektionsrunden zu einer Bibliothek, in der sich die besten Binder angereichert haben. Dieser Prozess ist mit den evolutiven Prinzipien des *survival of the fittest* vergleichbar. Die angereicherte Bibliothek kann in ein bakterielles System kloniert und anschließend sequenziert werden. Als zusätzliche Option können Mutationen in die erhaltenen Sequenzen durch mutagene PCR, die auch schon im SELEX-Prozess integriert sein kann, durchgeführt werden [39]. In Abbildung 1-6 ist der Ablauf einer SELEX schematisch dargestellt.

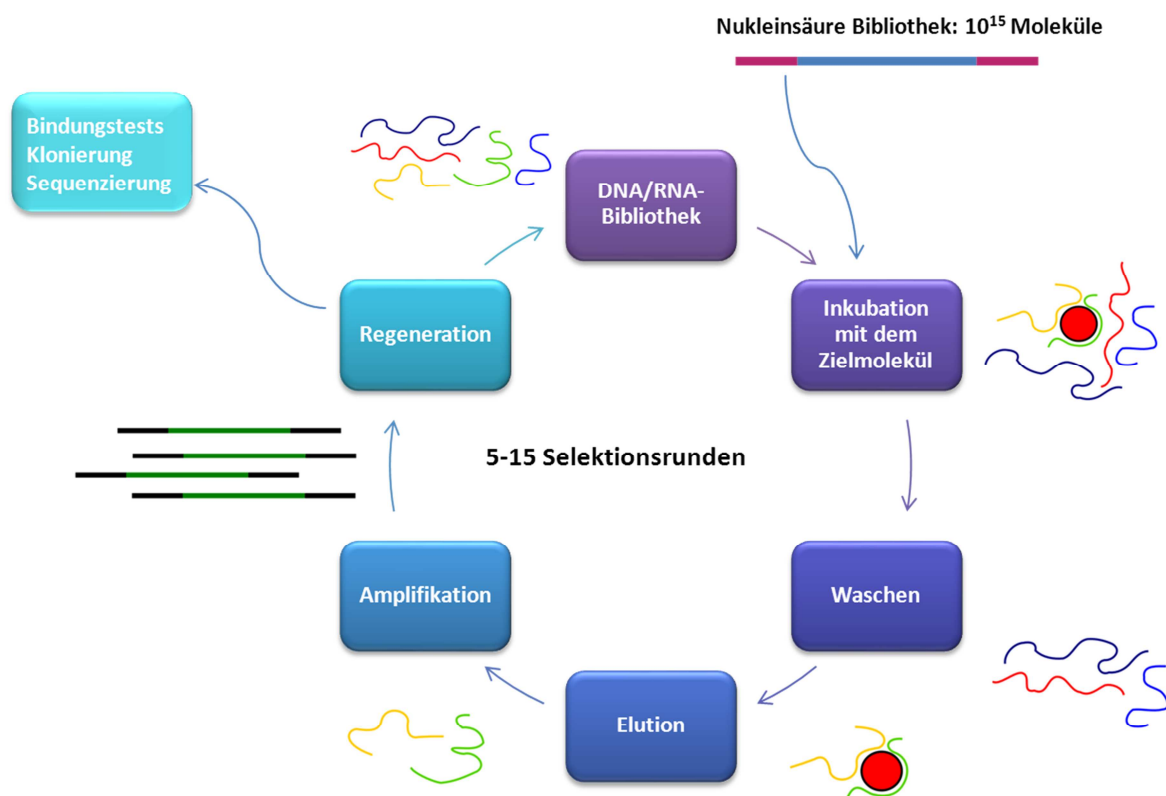


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.

Im Verlauf einer SELEX wird eine kombinatorische Startbibliothek einzelsträngiger Nukleinsäuren (RNA oder DNA) mit dem Target inkubiert. Durch wiederholte Waschschritte werden nicht oder nur schwach gebundene Nukleinsäuren von den bindenden separiert. Die gebundenen Spezies werden eluiert und über (RT-) PCR vervielfältigt. Um in eine neue Selektionsrunde einfließen zu können, werden die doppelsträngigen Nukleinsäuren wieder in ssRNA oder ssDNA überführt. Die angereicherte Bibliothek kann nach etwa 5-15 durchlaufenen Zyklen kloniert und sequenziert werden. Zu gegebenen Zeitpunkten können Bindungstests durchgeführt sowie zusätzlich Mutationen eingefügt werden. Modifiziert nach [40].

In den letzten 20 Jahren konnten mehr als 2000 RNA- und DNA-Aptamere selektiert werden [35], wobei die Zahl der jährlich neu veröffentlichten Aptamere durch die verbesserte Technik immer weiter zunimmt.

Das Methodenspektrum zur Selektion von Aptameren umfasst neben der Kapillarelektrophorese [41-45], der Filtration über Nitrozellulosefilter [36, 46-48], Affinitätschromatographie [34, 36, 49] auch die Selektion mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*) [50] oder SPR [51, 52]. Dabei kommen immer häufiger automatisierte Prozesse zum Einsatz, wobei die Zielmoleküle auf magnetisierte Partikeln immobilisiert werden, was die Zeit für eine SELEX erheblich reduzieren kann [35, 53-55]. Neben der klassischen Selektion von Aptameren mit Spezifität für singuläre Zielmoleküle werden immer häufiger auch ganze Zellen für eine sogenannte Zell-SELEX eingesetzt. Dies ermöglicht z. B. Aptamere spezifisch für entartete Zellen zu generieren [56-59].

1.7. G-Quadruplexe

Als G-Quadruplexe werden tertiäre Struktur motive in DNA oder RNA bezeichnet, die häufig in Guanin-reichen Nukleinsäuren auftreten. Dabei wird berücksichtigt, dass zur Formierung eines G-Quadruplexes eine Basenabfolge von: $G_{3+N_{1-7}}G_{3+N_{1-7}}G_{3+N_{1-7}}G_3$ vorliegen sollte, wobei N für jede beliebige Base inklusive Guanin steht [60].

Ein G-Quadruplex besteht aus einem Stapel übereinander gelagerter G-Quartette, die sich jeweils aus vier Guaninen zusammensetzen, welche über Hoogsten-Basenpaarungen zusammengehalten werden. Jedes Guanin geht hierbei zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem jeweils benachbarten Guanin ein [61]. Hoogsten-Basenpaarungen setzen sich aus zwei Wasserstoffbrückenbindungen zusammen und unterscheiden sich von den üblichen Watson-Crick-Basenpaarungen in der Hinsicht, dass eine der beiden Guanin-Basen mit den Atomen N1 und N2 die Protonen-Donatoren liefert, während die andere Guanin-Base mit den Atomen N7 und O6 die Protonen-Akzeptoren stellt (Abbildung 1-7 A). Dabei nimmt ein G-Quartett eine planare Konformation ein, sodass eine 4-strängige helikale Struktur entsteht [61]. Die sehr hohe Stabilität der G-Quadruplex-Strukturen wird durch sogenannte Stapelkräfte zwischen den Basen der verschiedenen Ebenen hervorgerufen. Diese beruhen auf Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen der quasi aromatischen Basen und Van-der-Wals-Kräften. Die Stabilität eines G-Quadruplexes wird weiterhin durch die Koordination eines monovalenten Metall-Kations im Zentrum im Inneren der helikalen Struktur stabilisiert. Dabei gehen die nach innen ragenden Sauerstoffatome Kation-Dipol-Wechselwirkungen ein, wobei das Metall-Kation zwischen zwei Ebenen eines G-Quartetts lokalisiert ist. Am häufigsten sind monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ , in Konzentrationen

die den physiologischen Pufferbedingungen entsprechen, an der Ausbildung von G-Quadruplex-Strukturen beteiligt [62]. Durch zahlreiche Analysen der dreidimensionalen Zusammensetzung von RNA- und DNA- G-Quadruplexen, z. B. NMR (Kernspinresonanzspektroskopie), CD-Spektroskopie (Circulardichroismus-Spektroskopie) und Röntgenkristallstrukturanalysen ist eine Vielfalt von möglichen Strukturen bekannt [63, 64]. Es wird zwischen parallelen bzw. antiparallelen Verläufen der Stränge bzw. zwischen inter- bzw. intra-molekularen Quadruplexen unterschieden (Abbildung 1-7 B-F). Zwischen den an den G-Quartetten beteiligten Guaninen liegen gewöhnlich eine bis sieben Basen. Diese Regionen bilden eine Schleifenstruktur aus und werden in dieser Arbeit als Loops bezeichnet.

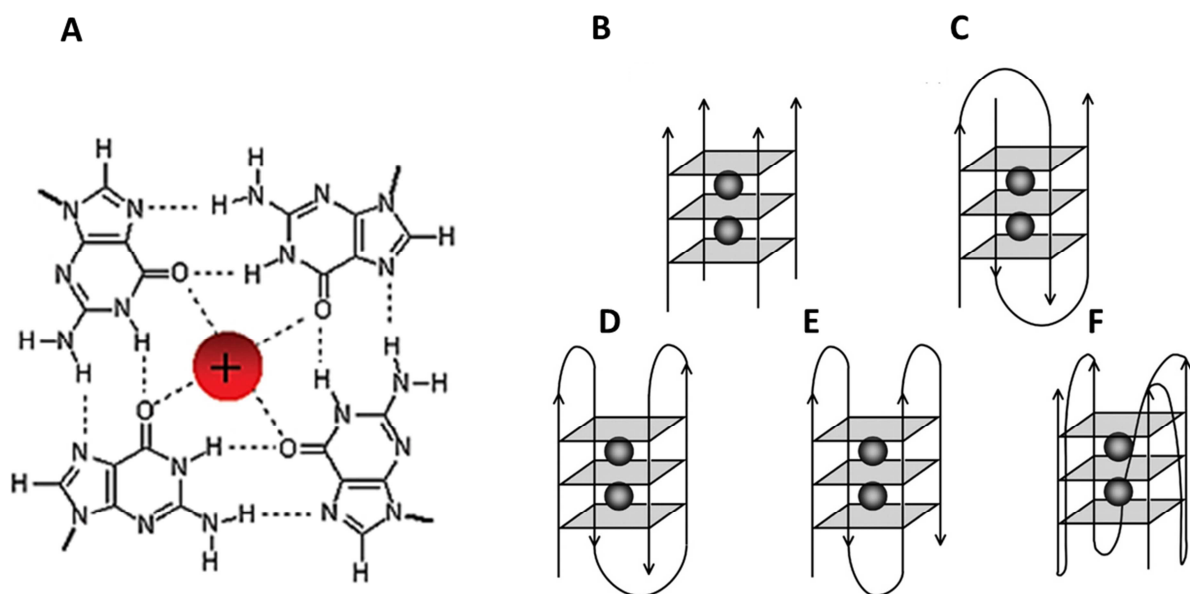


Abbildung 1-7: G-Quadruplex-Strukturen.

(A) Dargestellt ist ein G-Quartett. Dieses besteht aus einer Anordnung von vier Guaninbasen, die über Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Neben Stapel-Kräften spielt die Koordination von monovalenten Kationen im Inneren eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung [65]. (B-F) G-Quadruplexe bestehen aus übereinander gestapelten planaren G-Quartetts, sodass eine vier-strängige helikale Struktur entsteht. Dabei können bei der intermolekularen Konformation die Stränge in einer parallelen Form (B), bzw. anti-parallelen Form (C) vorliegen. Wird der G-Quadruplex aus nur einem Nukleinsäurestrang gebildet kann der G-Quadruplex ebenfalls eine anti-parallele Konformation (D/E) oder eine parallele Konformation (F) annehmen [66].

Zahlreiche selektierte Aptamere, die möglicherweise eine G-Quadruplex-Struktur annehmen, wurden bereits identifiziert. Hier können die spezifischen Wechselwirkungen zwischen der Nukleinsäure und dem *Targetmolekül* sowohl von den an den G-Quartetten beteiligten Guaninen, als auch von den Basen in den Loopregionen ausgeübt werden. Die nachstehende Tabelle zeigt einige Beispiele von identifizierten Aptameren, welche das Strukturmotiv eines G-Quadruplexes ausbilden (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Aptamere mit einer G-Quadruplex-Struktur.

Name	Nukleinsäure	Zielmolekül	Quelle
AS1411	DNA	Nukleolin	[67-70]
apt1-3	RNA	RANK (<i>receptor activator of NF-kappaB</i>)	[71]
ApT4-A	RNA	Thyroxin	[72]
R12	RNA	Rinder Prionen Protein	[73]
T30695	DNA	HIV-1-Integrase	[74]

Nukleinsäuren mit einem G-Quadruplex weisen ungewöhnliche biologische Effekte auf. So ist die Empfindlichkeit gegenüber Nukleasen herabgesetzt. Die Halbwertszeit von unmodifizierten Aptameren in Serum enthaltenem Medium liegt meist nur bei wenigen Minuten. DNA-Aptamere, welche das Strukturmotiv eines G-Quadruplexes ausbilden, können jedoch über mehrere Tage vor einem Abbau durch Nukleasen in Serum enthaltenem Medium geschützt sein [68, 70]. Neben der Inhibierung der Zellproliferation [75], als mögliche Folge der Ausbildung von G-Quadruplexen in Nukleinsäuren, werden auch eine erleichterte zelluläre Aufnahme [76], anti-virale Eigenschaften, Inhibierung von Protein-Aggregationen und pro-apoptotische Effekte beschrieben [68].

1.8. Modifizierungen von Nukleinsäuren

Für eine therapeutische Anwendung von Aptameren ist eine Verminderung der Degradation durch Nukleasen wünschenswert. Durch den Einsatz von DNA-/RNA-Polymerasen, welche den Einbau von modifizierten Nukleotidtriphosphaten tolerieren, können Aptamere mit erhöhter Nukleaseresistenz bereits während einer SELEX selektiert werden [77]. Dabei werden vorwiegend Derivate der 2'-Ribose verwendet. Modifizierungen an dieser Position tragen maßgeblich zu der Stabilität von RNA-Aptameren bei [35]. Häufig werden 2'-Fluor- und/oder 2'-Amino-Desoxypyrimidinnukleotidtriphosphate eingesetzt. Weiterhin wird die Ribose in Nukleotiden mit Purinen und Pyrimidinen mit einem 2'-O-Methyl-Rest modifiziert [78].

Der Austausch des Phosphatrückgrats gegen ein Phosphothioat vermindert ebenso wie ein terminales invertiertes Nukleotid-*Cap* (3'-3'-dTCap) den Abbau durch in Serum enthaltene Nukleasen. Diese Modifikationen können über chemische Synthese hergestellt werden.

Für eine verbesserte Pharmakokinetik werden am 5'-Ende von Aptameren Konjugationspartner wie Polyethylenglykol (PEG) oder Cholesterol angefügt. Diese senken

deutlich die renale Resorption und steigern dadurch die Bioverfügbarkeit. Über chemische Synthesewege können ortsgerichtete Linker, funktionelle Gruppen oder direkt Fluorophore angefügt werden. Durch funktionelle Gruppen wie primäre Amine, Thiol- und Aldehyd-Vorläufer können Konjugate wie PEG in einem diskreten stoichiometrischen Verhältnis und mit definierten chemischen Strukturen generiert werden [78].

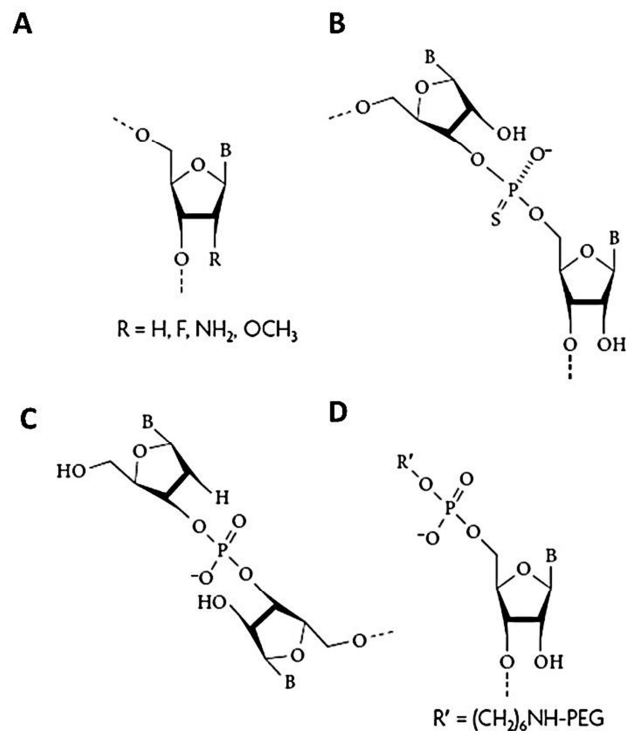


Abbildung 1-8: Aptamer-Modifikationen zur Steigerung der Stabilität.

(A) Nukleotide können an der 2'-Position der Ribose durch Fluor (F), Amino (NH_2) oder O-Methyl (OCH_3)-Gruppen modifiziert werden, um einer Degradation durch Nukleasen vorzubeugen. (B) Das Phosphatrückgrat kann durch ein Phosphorothioat enzymatisch ersetzt werden. (C) Ein invertiertes Nukleotid resultiert in einem End-Cap. (D) Über Linker werden am 5'-Ende funktionelle Gruppen angefügt, um Aptamere mit Konjugaten wie PEG zu verbinden [78].

Die Modifizierung von Aptameren nach erfolgter Selektion birgt jedoch die Gefahr, dass die dreidimensionale Struktur des Aptamers, welche für die spezifische Bindung zum Zielmolekül essentiell ist, empfindlich gestört wird.

1.9. Anwendungen von Aptameren in Therapie und Diagnostik

Im Verlauf der letzten Jahre rückte eine mögliche therapeutische Anwendung von Aptameren immer mehr in den Fokus des Interesses. Derzeit gibt es über 20 Aptamere von therapeutischer Relevanz, wovon sich ein Teil bereits in klinischen Studien befindet (Tabelle 1-2) [78]. Dabei üben Aptamere ihre therapeutische Wirkung hauptsächlich über die Blockade von biologischen Interaktionen aus.

Tabelle 1-2: Therapeutisch wirksame Aptamere in klinischen Studien.

Name	Zusammensetzung	Zielmolekül	Indikationsgebiet	Klinische Studie	Quelle
Pegaptanib/ Macugen (Pfizer/Eyetech)	RNA (2'-O-Methyl-Purine/ 2'-F-Pyrimidine/3'-3'- dTCap/PEG)	VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	seit 2006 in der EU zugelassen	[79-81]
AS1411 (Antisoma)	DNA (G-Quadruplex)	Nukleolin	akute myeloische Leukämie (AML)	Phase II	[68, 82, 83]
REG1 (RB006+RB007) (Regado Bioscience)	RB006: RNA 2'-F- Pyrimidine RB007: RNA 2'-O-Methyl- Purine/PEG	Faktor IXa	aortokonaler Bybass (CABG)	Phase II	[84, 85]
ARC1779 (Archemix)	DNA 2'-O-Methyl- Purine/Phosphorothioat/ PEG/3'-3'-dTCap	Von-Willebrand- Faktor	akutes Koronarsyndrom (ACS)	Phase II	[86, 87]
NU172 (ARCA biopharma)	DNA	Thrombin	aortokonaler Bybass (CABG)	Phase II	[88]
ARC1905 (Ophotech)	RNA (2'-O-Methyl-Purine/ 2'-F-Pyrimidine/3'-3'- dTCap/PEG)	Komplement- faktor 5	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	Phase I	[89]
E10030 (Ophotech)	DNA 2'-O-Methyl- Purine/PEG/3'-3'-dTCap	PDGF (<i>platelet- derived growth factor</i>)	altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	Phase II	[90]

Der Einsatz von Aptameren als therapeutisches Agens bietet viele Vorteile. So ist die Synthese für kleine Nukleinsäuren (< 100 nt) mittlerweile kostengünstig, schnell und in hohen Ausbeuten zu erzielen. Die chemische Produktion bietet zudem den Vorteil, dass beispielsweise gegenüber der biologischen Produktion von Antikörpern, Kontaminationen durch Bakterien oder Viren, nahezu ausgeschlossen werden können [78]. Bereits während des SELEX-Prozesses können modifizierte Nukleotide zur Erhöhung der Nuklease-Resistenz eingesetzt werden [77]. Zahlreiche Modifikationen können auch postselektiv eingefügt werden.

Aptamere werden als nicht immunogen eingestuft und weisen keine toxischen Eigenschaften auf. Die meisten Aptamere haben ein Molekulargewicht von nur 5-15 kDa (15-50 nt). Diese relativ kleine Größe ermöglicht einen effizienten Zugang zu zellulären Kompartimenten. Es liegt jedoch keine generelle Membrangängigkeit vor. Als mögliche Zielmoleküle kommen für Aptamere nicht nur extrazelluläre *Targets* (z. B. Rezeptoren) in Frage, sondern auch Moleküle im Zellinneren. Ferner werden Aptamere für die spezifische Erkennung von speziellen Zelllinien eingesetzt. Die hohe Affinität und Spezifität sind ebenso wichtige Charakteristika wie die Unempfindlichkeit gegenüber Denaturierung [91].

Der Einsatz von Aptameren als therapeutisches Agens unterliegt jedoch einigen Einschränkungen. So führt die geringe Größe zu einer schnellen Verteilung im Körper bzw. zu einer schnellen renalen Filtration. Um dies zu umgehen, werden Konjugationspartner wie PEG oder Cholesterol an die Nukleinsäuren angefügt [92]. Dies führt zu einer deutlichen

Verbesserung der Pharmakokinetik und zu einer Steigerung der *Clearance*-Rate von wenigen Minuten zu mehreren Stunden im Mausmodell. Unmodifizierte Aptamere werden im Serum durch die dort enthaltenen Nukleasen schnell abgebaut [35]. Für die therapeutische Anwendung sind Modifikationen in den Zuckerbestandteilen der Aptamere bzw. der Phosphodiesterbrücke unumgänglich. Einziges bisher zugelassenes Medikament auf der Basis eines Aptamers ist das von Pfizer/Eyetech produzierte Pegaptanib oder Macugen® [80, 81]. Dabei handelt es sich um ein stark modifiziertes RNA-Aptamer, welches zur Behandlung der feuchten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt wird. Das Aptamer bindet hochspezifisch an die pathogene Form VEGF₁₆₅ und blockiert dessen Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor, wodurch der Verlust der Sehfähigkeit hinausgezögert werden kann.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Aptameren bildet der Aptamer-vermittelte Zell-spezifische Transport von Substanzen ins Zellinnere. Dabei kann die Verbindung von Aptamer und dem möglichen Wirkstoff über unterschiedliche Strategien erreicht werden. So kommen kovalente Verknüpfungen ebenso in Betracht wie die nicht-kovalente Verbindung über Biotin-Streptavidin, Basenpaarungen oder physikalische Konjugate [93].

In mehreren Studien konnten bereits anti-Tumor-Medikamente wie Cisplatin, Dextran, Daunorubicin, Doxorubicin und Chlorin-e₆ erfolgreich und spezifisch von Zellen über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden [94-102].

Aber nicht nur therapeutisch wirksame niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe können mit Aptameren konjugiert werden. Auch Nukleinsäuren selbst können klinisch relevante Eigenschaften beisteuern. So wird der Einsatz von *small interfering RNAs* (siRNAs) als neue Bio-Medikamente seit einigen Jahren intensiv erforscht [103, 104]. Eine Herausforderung bei der klinischen Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) liegt in der spezifischen Internalisierung der siRNAs. Denn erst im Zytosol sorgen die doppelsträngigen Nukleinsäuren für die sequenzspezifische Inhibierung der Expression ihrer Zielgene (Abbildung 1-9).

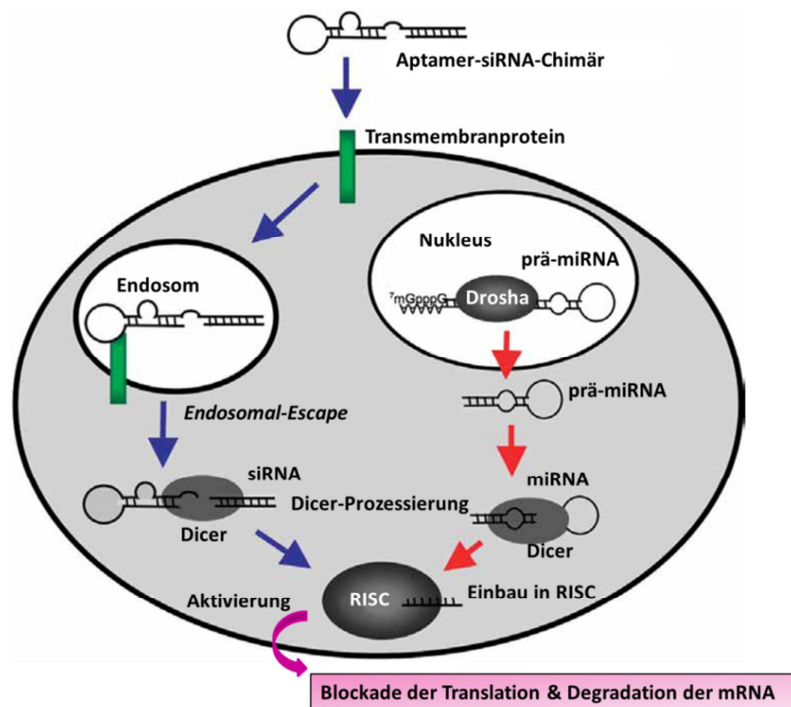


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz nach Internalisierung von Aptamer-siRNA-Chimären.

Dargestellt ist der vorgeschlagene Ablauf der RNA-Interferenz (RNAi) nach erfolgter Internalisierung von Aptamer-siRNA-Chimären bzw. der RNAi-Mechanismus von miRNAs. Mittels der spezifischen Bindung von Aptamer-siRNA-Chimären an Transmembranproteine können Rezeptoren in Kombination mit Chimären internalisiert werden. Zunächst ist der Komplex aus Zielstruktur und Chimär in Endosomen lokalisiert. In einem als *Endosomal-Escape* bezeichneten Prozess gelangen Aptamer-siRNA-Chimären ins Zytosol. Im Zellkern führt die Transkription von miRNA-Genen zu primären-miRNAs, welche von Drosha zu prä-miRNAs (70-80 nt) prozessiert werden. Nach Transport ins Cytoplasma werden prä-miRNAs von Dicer zu miRNAs prozessiert. Dicer ist auch in der Lage Aptamer-siRNA-Chimären in siRNAs (19-22 nt) zu prozessieren. Nach Einbau von mi/siRNAs in den RISC-Komplex wird dieser aktiviert. Der Leitstrang verbleibt im RISC-Komplex und bindet spezifisch an die Ziel-Sequenzen der mRNA. Dies führt zur Degradation der mRNA (siRNA) oder zur Blockade der Translation (miRNA). Modifiziert nach [105].

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen eukaryotischen Mechanismus bei welchem die Expression von Genen zielgerichtet posttranskriptionell stillgelegt werden kann [106]. Für die Entdeckung dieses Prozesses wurde 2006 der Nobelpreis für Physiologie bzw. Medizin vergeben [107]. Nach der Transkription von miRNA-Genen (*microRNA*) durch Polymerase II nimmt die entstandene RNA eine Haarnadel-Struktur an und wird als pri-miRNA (*primary-miRNA*) bezeichnet. Diese wird von der RNase III Drosha im Nukleus zu 70-80 nt langen prä-miRNAs (*precursor-miRNAs*) prozessiert und im Anschluss ins Zytosol transportiert. Dort werden prä-miRNAs durch Dicer geschnitten und es entstehen sogenannte miRNAs. Diese werden ebenso wie siRNAs, welche von Dicer aus längeren dsRNA-Fragmenten generiert werden, in einen RISC-Komplex (*RNA-induced-silencing-complex*) eingebaut. Nach der Entwindung der dsRNA verbleibt nur noch der Leitstrang im RISC-Komplex, welcher über spezifische Basenpaarungen an die Ziel-Sequenz der mRNA bindet. Dort wird die Degradation der mRNA (siRNA-Mechanismus) bzw. die Blockade der Translation (miRNA-Mechanismus) initiiert [103].

Um das Potenzial von Aptameren als Zell-spezifische *Delivery*-Moleküle zu untersuchen, wurden u. a. Aptamere spezifisch für PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) verwendet, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. PSMA ist ein Transmembranprotein, welches bei Krebszellen des Prostatakarzioms und im vaskulären Endothel gehäuft vorkommt [93]. Das Transmembranprotein wird kontinuierlich über das Endosom recycelt und eignet sich daher gut als Studienobjekt für die Internalisierung von Wirkstoffen. Zwei 2'-F-modifizierte RNA-Aptamere mit Spezifität für PSMA konnten selektiert werden [108], beide weisen Bindungskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich auf.

Bisher waren drei Forschergruppen in der Lage erfolgreich PSMA-Aptamere für die spezifische Internalisierung von siRNAs in PSMA-positiven LNCaP-Zellen zu nutzen.

Über Streptavidin konnten biotinylierte Aptamere mit siRNAs spezifisch für Lamin A/C bzw. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) nicht-kovalent verbunden werden [109] (Abbildung 1-10 A). Dabei wurde die cytoplasmatische Freisetzung der siRNA über einen reduzierbaren Linker zwischen der siRNA und dem Biotin verstärkt. Ein ähnlicher Ansatz führte durch die Konstruktion von Aptamer-siRNA-Chimären zum Knockdown der Tumorgene *plk1* und *bcl2*. Dabei wurde das Aptamer am 3'-Ende kovalent mit der Sequenz für die siRNA verknüpft und mit dem zweiten Strang der siRNA hybridisiert [105, 110] (Abbildung 1-10 B). Um die Kosten für eine mögliche therapeutische Anwendung zu senken und die pharmakokinetischen Effekte zu verbessern, wurde das ursprüngliche Aptamer verkürzt und ein PEG-Anker angefügt.

Neben der Konjugation von siRNAs konnten chemotherapeutische Wirkstoffe sowie Toxine erfolgreich mit dem PSMA Aptamer verbunden werden. So wurde das Glykoprotein Gelonin über einen Crosslinker (SPDP, N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionat) mit dem Aptamer kovalent verbunden (Abbildung 1-10 C) und führte nach selektiver Internalisierung in LNCaP-Zellen zur Inhibierung der Proteinbiosynthese [111].

Ein großer Fortschritt in der Krebstherapie wäre die Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen durch eine Zelltyp-spezifische Aufnahme von Anti-Tumor-Medikamenten wie Dextran, Daunorubicin, Doxorubicin und Cisplatin. In den letzten sieben Jahren wurden diesbezüglich große Fortschritte erzielt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass PSMA-präsentierende Zellen in der Lage sind, Aptamer-Nanopartikel-Konjugate (Abbildung 1-10 D) spezifisch aufzunehmen und sich die chemotherapeutische Wirkung intrazellulär entfaltet [95-97, 99, 102, 112].

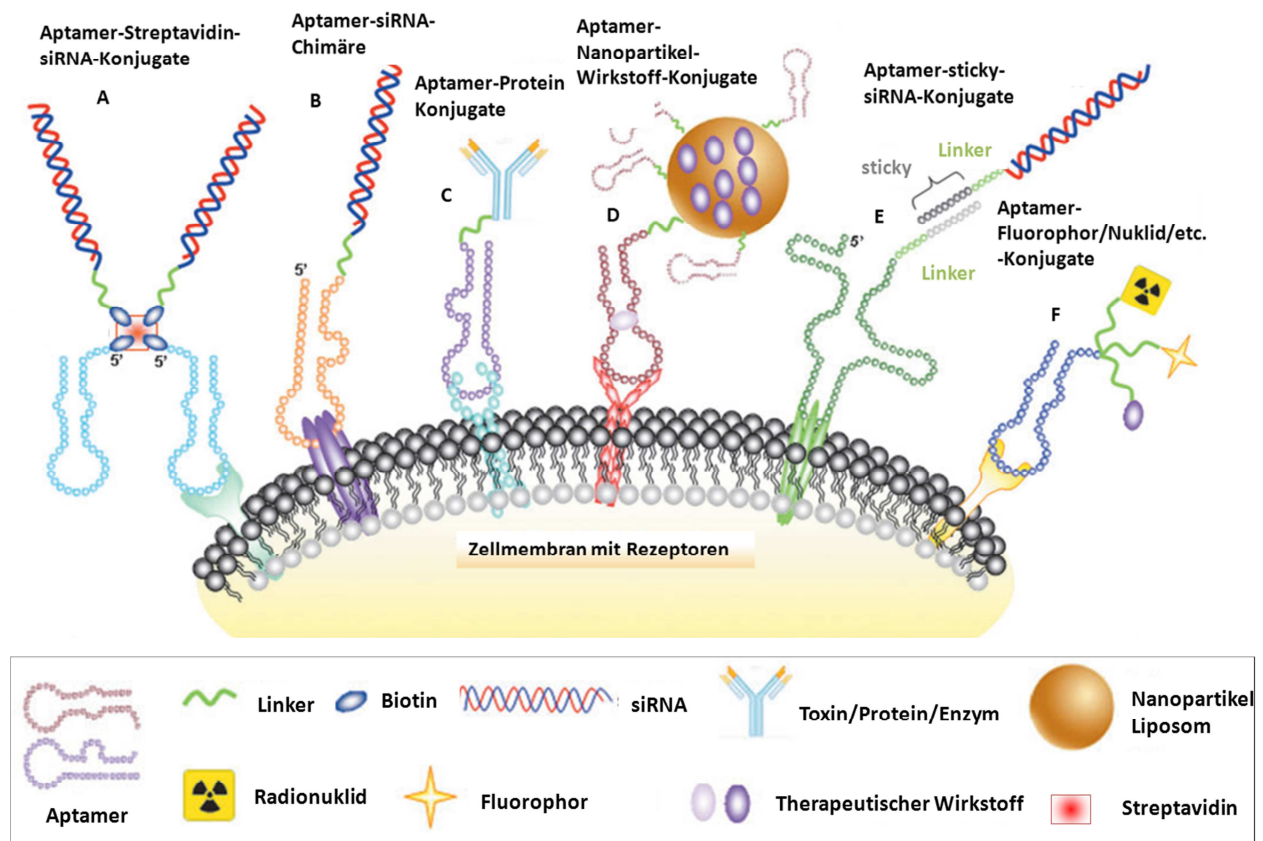


Abbildung 1-10: Aptamer-vermittelte-Zell-spezifische Internalisierung.

Schematische Darstellung möglicher Konstrukte für die Aptamer-spezifische Aufnahme über Zellrezeptoren. (A) siRNAs wurden über Streptavidin mit biotinylierten Aptameren verbunden. (B) siRNA-Aptamer-Chimäre. (C) Konjugate aus Protein/Enzym/Toxin und Aptamer. (D) Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugat. (E) Konjugat aus siRNA und Aptamer über eine sticky-Linker-Verbindung. (F) Konjugat aus Aptamer und Radionuklid/ Fluorophor o.ä. Modifiziert nach [93].

Auch mit Hilfe von Aptameren für das gp120-Hüllprotein von HIV-1 konnten erfolgreich siRNAs für die antivirale Therapie sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell in Zielzellen eingeschleust werden. Dabei wurden die siRNAs mit dem Ziel HIV-1 *tat/rev* über einen Linker an das Aptamer hybridisiert (Abbildung 1-10 E) oder kovalent mit dem Aptamer verbunden [93, 113-115].

Neben relativ großen Komponenten wie Proteinen oder Nanopartikeln wurden Fluorophore und Radionuklide (Abbildung 1-10 G) erfolgreich über Aptamer-vermittelte Endozytose von verschiedenen Zellen aufgenommen [116, 117]. Auch durch die Konjugatbildung aus Liposomen und Aptameren konnten chemotherapeutische Wirkstoffe spezifisch Zellen zugeführt werden [94]. Die nachstehende Tabelle 1-3 gibt einen Überblick der bisher verwendeten Strategien und eingesetzten Aptamere für die Internalisierung verschiedener Substanzen und spiegelt den aktuellen Stand dieser Forschung wider [93, 114].

Tabelle 1-3: Aptamere als *Delivery-Vehikel*.

Zielmolekül	Nukleinsäure	Ladung/Strategie für Internalisierung	Quelle
PSMA (<i>prostate-specific membrane antigen</i>)	2'F-RNA	• siRNA: nicht-kovalente Konjugate (Lamin A/C) über Streptavidin	[109]
		• siRNA: bivalente Aptamer-siRNA-Konjugate (EEF2, <i>eucaryotic elongation factor 2</i>)	[118]
		• siRNA: kovalente Chimäre (Plk1/ Bcl-2)	[105, 110]
		• Toxin: kovalente Aptamer-Gelonin-Konjugate	[111]
		• Wirkstoff-Nanopartikel-Aptamer-Konjugate (Dextran/Docetaxel/Pt(IV)/Doxorubicin)	[95-97, 99, 102, 112]
CD4	2'F-RNA	• siRNA/Fluorophore: nicht-kovalente Chimäre mit siRNAs (Survivin/BIM/CD4/BAD) und FITC/Rhodamin	[119-121]
HIV-1 gp120	2'F-RNA	• siRNA: nicht-kovalent über eine <i>sticky</i> -Verbindung (HIV1 <i>tat/rev</i> , CD4 TNPO3)	[93, 113-115]
		• siRNA: kovalente Chimäre (HIV-1 <i>tat/rev</i>)	
TN-C (<i>Tenasin-C</i>)	2'F-RNA	• Radionuklide/Fluorophore über kovalente Verknüpfung	[116, 117]
EPGF (<i>epidermal growth factor</i>)	2'F-RNA	• Gold-Nanopartikel: nicht-kovalente Konjugate	[122]
PTK7 (<i>protein tyrosin kinase 7</i>)	DNA	• Wirkstoff: kovalente Verknüpfung über säurelabile Verbindung (Doxorubicin)	[100]
		• Wirkstoff: Dextran-Liposom-Aptamer Konjugate	[123]
		• Wirkstoff: Aptamer-Daunorubicin-Konjugate	[101]
TfR (<i>transferrin receptor</i>)	DNA/RNA	• Enzym: kovalentes Aptamer-Konjugat (L-iduronidase)	[124]
		• Protein: Streptavidin-RNA/DNA-Konjugate	
Nukleolin	DNA	• Wirkstoff: Cisplatin-Liposom-Aptamer-Konjugate	[94]
Mucin-1	DNA	• Wirkstoff: kovalente Chlorin-e6-Aptamer-Konjugate	[98]

Neben dem Zelltyp-spezifischen Transport von therapeutisch wirksamen Substanzen können Aptamere auch für die klinische Diagnostik eingesetzt werden. Dabei sind Aptamere in der Lage, spezifisch eine Zellpopulation nachzuweisen und aus einem großen Pool verschiedener Zellen zu selektieren [125]. Weiterhin können funktionalisierte Aptamere, z. B. Aptamer-Nanopartikel, für *in vivo Imaging* Analysen eingesetzt werden [126-128].

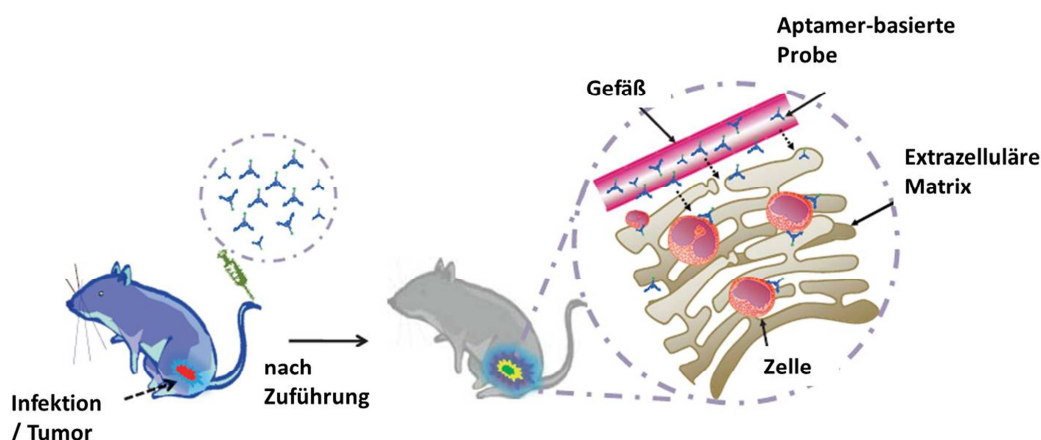


Abbildung 1-11: Anwendung von Aptameren für molekulares *in vivo Imaging*.

Aptamere können im Mausmodell systemisch über die Schwanzvene zugeführt werden. Auf dem Weg zum Zielmolekül müssen Aptamere physiologische Barrieren wie Gefäßwände, die extrazelluläre Matrix und den Intestinalraum passieren. Konjugiert mit Fluorophoren, Kontrastmitteln oder Nanopartikel können Aptamere bei der Visualisierung von bestimmten Krankheitsbildern, z. B. durch die Bindung an spezifische Tumormarker helfen. Modifiziert nach [126].

1.10. Das IL-6R-bindende Aptamer 16-3A

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Cindy Meyer [6] wurden unter Anwendung des *in-vitro*-Selektionsverfahrens SELEX IL-6R-spezifische RNA-Aptamere isoliert. Es konnten nach 16 durchgeführten Selektionsrunden sechs verschiedene RNA-Sequenzen identifiziert werden, die ein gemeinsames G-reiches Konsensus-Motiv aufwiesen (Abbildung 1-12).

```

16-1  GU-----CAUGGGGUGGCUUGGUGUGGGUGUGAAGGGCAUUAUGUCGCUGACUGUGCGUUAGC
16-3  CU-----UAUAGGGGAGGCUUGGUGAGGGAAUUAAGAGAAUUAACGGUCUAGUUCACCUCGA
16-2  AACGUCUACGGAUUCUACCAGGGGGCGGCUUGGAGUGGGGU-----UGGAGUCCGAUAAG-----GU
16-8  GUG-----CUUACCUACUCGGGGGUGGCUUGGAGUGGG-----AAACAGUAAGGUGCGCAUG----GUUUAG
9-5   CUG--UGAGCG-----CUUUGGGGUGGCUUGGAGAGGGUAUGCAGCUCAUGGGUAUUCAGCUUC-----UG
9-6   GU-----CCUGGGGGCGGCUUGGUGUGGGUGUGAAGGGCAUUAUGUCGCUGACUGUGCGUUAGC

```

Abbildung 1-12: Sequenzen der RNA-Aptamere spezifisch für den sIL-6R.

Dargestellt sind die Sequenzen der RNA-Aptamere mit Spezifität für den sIL-6R nach 16 bzw. 9 Selektionsrunden. Die Aptamere weisen ein G-reiches Konsensusmotiv (**blau**) sowie je ein konserviertes Cytosin und Uracil (**grün**) auf. Die Darstellung erfolgte in 5'-3'-Richtung. Auf die Darstellung der konstanten 5' und 3'-terminalen Regionen wurde verzichtet [6].

Durch radioaktive Filterbindungsstudien wurden die Bindungseigenschaften der Aptamere an den sIL-6R überprüft und dafür charakteristische Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) bestimmt. Dabei zeichnete sich das 106 nt lange RNA-Aptamer 16-3 durch einen K_d -Wert von 20 nM aus. Für die sehr spezifische Bindung an das Protein sIL-6R waren keine Mg^{2+} Ionen erforderlich, allerdings störten hohe Magnesium-Konzentrationen (>12 mM) die Bindung. Das Aptamer konnte in einem pH-Bereich von pH 6-8 an sein Zielmolekül binden.

Die Abwesenheit von monovalenten Kationen wie Na^+ , K^+ führte zu einem deutlichen Affinitätsverlust. Weiterhin konnten sowohl in Filterbindungsstudien als auch in Gel-Shift-Assays Kompetitionen mit IL-6 oder auch dem gp130 um die Bindungsstellen am IL-6R ausgeschlossen werden [6].

Das Aptamer 16-3 war zudem in der Lage, das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 (HIL-6) zu binden. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus humanem IL-6 und dem löslichen IL-6R, welche über einen flexiblen Peptidlinker (29 AS) kovalent verbunden sind [129] (Abbildung 1-13).

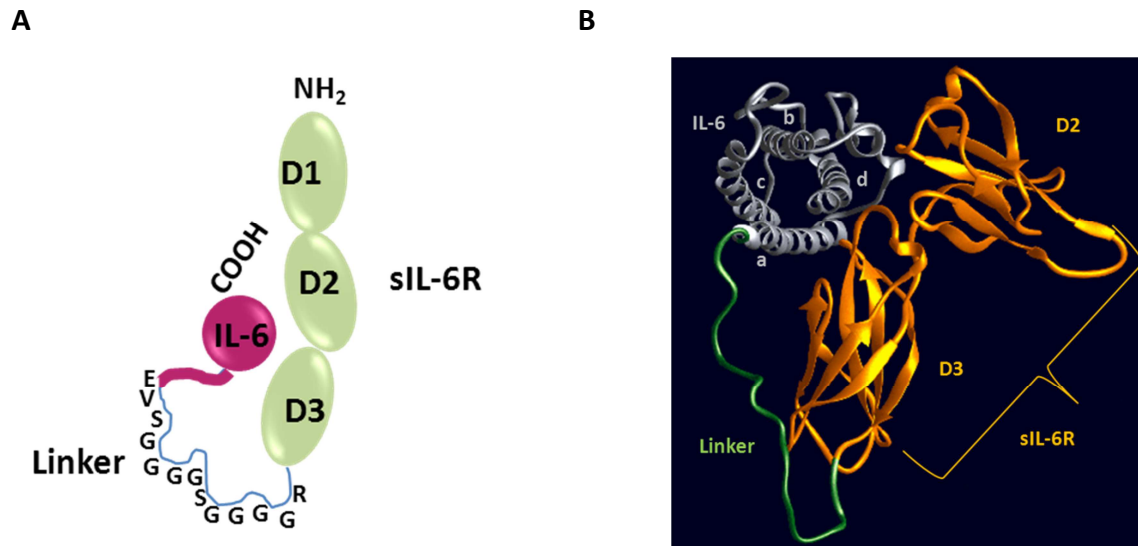


Abbildung 1-13: Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6.

(A) Schematische Darstellung des bioaktiven Fusionsproteins Hyper-IL-6. Die extrazellulären Domänen des sIL-6R (D1-D3) sind über einen flexiblen Polypeptidlinker mit dem N-terminalen Teil des IL-6 verbunden. **(B)** Modell des Designer-Zytokins Hyper-IL-6. Dabei sind die Domänen D2 und D3 des sIL-6R in gelb dargestellt, wobei die Ig-ähnliche Domäne D1 fehlt. Modifiziert nach [130].

Der Linker setzt sich aus dem nicht-helikalen Bereich (16 AS) am N-Terminus des IL-6 und 13 weiteren Aminosäuren zusammen, die vorwiegend aus Serin und Glycin bestehen (Abbildung 1-13 A). Am C-Terminus des IL-6 wurden 28 Aminosäuren nicht in das Fusionsprotein integriert. Ausgehend vom ursprünglichen Designer-Zytokin (Abbildung 1-13 B) wurde die Immunglobulin-ähnliche Domäne D1 in das bioreaktive Fusionsprotein eingeschlossen. Somit ergibt sich für das in dieser Arbeit verwendete Protein eine Länge von 510 AS. Bedingt durch zahlreiche Glykosylierungen weist das Protein ein Molekulargewicht von ~ 80 kDa auf [131]. Das Designer-Zytokin ist in der Lage, die biologische Funktion eines Komplexes aus IL-6 und dem sIL-6R vollständig zu imitieren. Durch die kovalente Verknüpfung des sIL-6R und IL-6 kann die Empfindlichkeit gegenüber gp130 präsentierenden Zellen sogar um das 100- bis 1000-fache gesteigert werden [129]. Im Mausmodell löst die Injektion von HIL-6 die Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen aus [132] und zeigt eine regenerationsbeschleunigende Wirkung nach Leberschädigungen [133].

Experimente zur Identifizierung des minimalen Bindemotives des Aptamers 16-3 führten zunächst zu einem 47mer (16-3B), welches neben einer Affinität zu HIL-6 auch die Fähigkeit der Bindung an den nativen IL-6R besitzt. Weitere Minimierungsversuche führten zu einer nur 19 nt kurzen Variante, dem Aptamer 16-3A, welches dem G-reichen Konsensusmotiv der isolierten Klone (Abbildung 1-12) entspricht [6].

In Mutationsanalysen wurde die Hypothese bestätigt, dass das Aptamer eine stabilisierende G-Quadruplex-Struktur ausbildet, indem am G-Quadruplex beteiligte Guaninbasen gegen Uracil ausgetauscht wurden [6]. In Abbildung 1-14 ist die hypothetische Struktur des G-Quadruplexes 16-3A schematisch dargestellt.

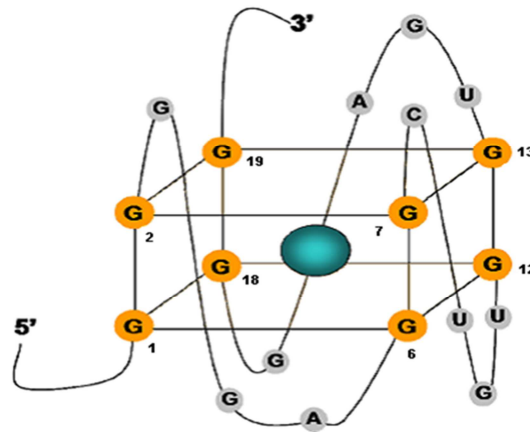


Abbildung 1-14: Mögliche G-Quadruplex-Struktur des Aptamers 16-3A.

Schematische Darstellung des 19 nt RNA-Aptamers 16-3A, welches die postulierte Struktur eines G-Quadruplexes annimmt. Die putativ an der Formation beteiligten Guaninbasen sind orange markiert. Zentral gelegen ist ein monovalentes Kation. Modifiziert nach [6].

Auch in Studien mittels CD-Spektroskopie [5] konnte die Ausbildung einer G-Quadruplex-Struktur des Aptamers 16-3A gezeigt werden.

2. Zielsetzung

Aptamere sind kurze Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung spezifisch und mit hoher Affinität ihre Zielmoleküle binden können. Viele Membranproteine und insbesondere Rezeptoren unterliegen fortlaufenden Recycling-Prozessen bzw. werden nach Liganden-Bindung endozytiert. Die Zelltyp-spezifische Internalisierung von Aptameren konnte in mehreren Studien bereits beschrieben werden. So wird Aptameren ein großes therapeutisches Potential eingeräumt, da sie zusammen mit therapeutisch wirksamen Substanzen spezifisch von Zellen über Oberflächen-Marker aufgenommen werden können.

Das Guanin-reiche Aptamer 16-3A weist eine Spezifität für den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) auf. Dieser bindet das pleiotrope Zytokin Interleukin-6, welches wichtige Funktionen bei Entzündungsreaktionen übernimmt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung des 19 nt langen RNA-Aptamers 16-3A. Mittels Mutationsanalysen sollte unter Anwendung von analytischen Filterbindungsstudien und der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) der Einfluss einzelner Basen auf die Interaktion zwischen Aptamer und dem IL-6R untersucht werden. Weiterhin sollte mit geeigneten Zellen unter Anwendung der Durchflusszytometrie und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie die Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor analysiert werden. Mit Hilfe dieser Fluoreszenz-basierten Methoden sollte geprüft werden, ob sich das Aptamer 16-3A als Vehikel für den transmembranen Transport eignet. Ob die Bindung bzw. die Internalisierung des Aptamers die biologische Aktivität des IL-6-Rezeptorkomplexes beeinflusst, sollte mittels Proliferationsstudien untersucht werden. Die Auswirkungen der kovalenten Verknüpfung von siRNAs mit dem Aptamer auf die Affinität zum IL-6R sollte *in vitro* mittels Filterbindungsstudien und über durchflusszytometrische Studien überprüft werden.

3. Material

3.1. Chemikalien

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

3.2. Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 3-1: Puffer und Lösungen für die Nukleinsäureanalytik.

Name	Zusammensetzung
Aminohexansäure-Puffer	20% (v/v) Methanol, 40 mM Aminohexansäure
Ammoniumpersulfat-Lösung	10% (v/v) APS
DNA-Probenpuffer (6x)	60% Glycerol (v/v), 10 mM Tris (pH 7,6), 0,025% Bromphenolblau (w/v), 0,025% (w/v) Xylen Cyanol FF, 60 mM EDTA
Hybridisierungspuffer (10x)	800 mM Tris-HCl, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2% (w/v) Tween20, pH 8,8
PNK-Puffer A (10x)	500 mM Tris, 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA, pH 7,6
RNA-Elutionspuffer	0,3 M Natriumacetat, pH 5,2
RNA-Probenpuffer (2x)	8 M Harnstoff, 0,025% Bromphenolblau (w/v), 0,025% (w/v) Xylen Cyanol FF
Selektionspuffer (1x)	1x PBS, 3 mM MgCl ₂ , pH 7,4
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris, 250 mM Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7,8
Transkriptionspuffer (3x)	120 mM Tris-HCl, 15 mM DTT, 6 mM Spermidin, 4,5% (v/v) PEG6000, 0,03% (v/v) Triton-X100, pH 8,1

Tabelle 3-2: Puffer und Lösungen für die Protein-Analytik.

Name	Zusammensetzung
BCIP-Lösung (10x)	0,5% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) in DMF
BSA-Lösung	5% (w/v) in TBS, steril filtriert
CAPS-Puffer	10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol, pH 11
<i>Coomassie</i> -Entfärbelösung	20% (v/v) Essigsäure
<i>Coomassie</i> -Färbelösung	0,25% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> , 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
NBT (10x)	1% (w/v) NBT in Tris-HCl-MgCl ₂ pH 9,5
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8
SDS-Laufpuffer (5x)	0,125 M Tris, 0,96 M Glycin, 0,5% SDS, pH 8,3
SDS-Probenpuffer (2x) reduzierend	4% (v/v) SDS, 20% v/v Glycerin, 125 mM Tris, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025% Bromphenolblau (w/v), pH 6,8
TBS (10x)	153 mM Tris, 1,37 M NaCl, pH 7,4
TBST	15,3 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20, pH 7,4
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8
Western-Blot-Puffer	92,5 mM Tris, 4 mM MgCl (H ₂ O) ₆ , pH 9,5

Tabelle 3-3: Medien, Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten.

Name	Zusammensetzung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x), high glucose</i>
FKS	100% FKS
Pen/Strep (100x)	6,25 mg/mL (w/v) Penicillin G Natriumsalz, 10 mg/mL (w/v) Streptomycin, 9 mg/mL (w/v) NaCl in Aqua dest.
Trypanblau	0,4 % in 1x PBS, steril filtriert
PBS (10x)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 65 mM Na ₂ PO ₄ H 15 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

3.3. Nukleotide und Radionukleotide

Nukleosid-5'-triphosphate (NTPs)	Roth (Karlsruhe)
[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
2'-F-CTP	IBA (Göttingen)
2'-F-UTP	IBA (Göttingen)

3.4. Enzyme

FastAP TM Alkalische Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	Fermentas (St. Leon-Rot)

3.5. Längenstandards

miRNA Marker	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler TM Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

3.6. Kommerziell erhältliche Kits

Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza (Köln)
Recombinant human Dicer Enzyme Kit	Genlantis über PeqLab (Erlangen)

3.7. Antikörper

Tabelle 3-4: Verwendete Antikörper.

Name	Wirt	Firma
anti-Aktin (human, murin)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology® Inc. (Santa Cruz, USA)
anti-gp130 (human)	Maus, monoklonal	R&D Systems (Abingdon, UK)
anti-Maus-APC	Ziege, polyklonal	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-Maus-IgG ₁ -FITC	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology® Inc. (Santa Cruz, USA)
anti-IL-6R (human)	Maus, monoklonal	www.antikoerper-online.de
anti-pSTAT3 (human, murin)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology® Inc. (Santa Cruz, USA)
anti-pSTAT5 (human, murin)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology® Inc. (Santa Cruz, USA)
anti-Tetra-His	Maus, monoklonal	Qiagen (Hilden)
anti-rabbit-IgG-AP	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich (München)

3.8. Wachstumsfaktoren und Proteine

Interleukin-3 (murin)	Merck (Darmstadt)
Interleukin-6 (human)	Cell Signaling Technology über New England BioLabs® Inc. (Frankfurt a.M.)

Folgende Proteine wurden freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern aus Kiel (Prof. Dr. Stefan Rose-John, Prof. Dr. Jürgen Scheller, Prof. Joachim Grötzinger und Dr. Inken Lorenzen) zur Verfügung gestellt:

D3-Domäne von Hyper-IL-6	rekombinant aus <i>E.coli</i>
Hyper-IL-6	rekombinant aus CHO-Zellen

3.9. Synthetische Oligonukleotide

Alle angegebenen Oligonukleotide wurden von den Firmen IBA (Göttingen) oder Invitrogen (Karlsruhe) HPLC-gereinigt bezogen.

Tabelle 3-5: RNA-Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5'→ 3'	Modifizierung
Dicer_Substrat _antisense_488/647N	CCU UUC AGC UCA UUC CAG GCA UCC CUC UUG GCC UUG CCC CA	5'-modifiziert mit Atto488 und an Position 36 mit Atto647N
G17U	GGG GAG GCU GUG GUG AUG G	-
G17U_Atto647N	GGG GAG GCU GUG GUG AUG G	5'-modifiziert mit Atto647N
gapdh_antisense_Atto488	GAA AAG CUU CCC GUU CUC AGC CUU GA	5'-modifiziert mit Atto488
gapdh_sense_Atto647N	AAG GCU AGA ACG GGA AGC UUU	intern modifiziert an Position 7 mit Atto647N
16-3A	GGG GAG GCU GUG GUG AGG G	-
16-3A_Atto647N	GGG GAG GCU GUG GUG AGG G	5'-modifiziert mit Atto647N

Tabelle 3-6: DNA-Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5'→ 3'
27-D-T_Dimer	CCC CTC CGA CAC CAC TAC CAC GGT TTA GGG GTG GGT GGG TGG GAC GGT TTA GGG GTG GGT GGG TGG G
con_siRNA1_mSTAT3	AAG GAC CGA CGC GCG ACC GAC TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGT CGG TCG CGC GTC GGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
con_siRNA1_mSTAT5	AAG GGG CGC GTA GGA CGC GAG TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACT CGC GTC CTA CGC GCC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
con_siRNA2_mSTAT3	AAG GAC TAT TAC CAT ACG TTG TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACA ACG TAT GGT AAT AGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
con_siRNA2_mSTAT5	AAG GGC GTA GCG CAA CAA CTC TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGA GTT GTT GCG CTA CGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
G17U-siRNA1_mSTAT3	AAG GGG GCC AGG CCA ACC ACC TTT ATT CCA TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGG TGG TTG GCC TGG CCC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
G17U-siRNA1_mSTAT5	AAG GCG GAG CAC CAG GTG GGG TTT ATT CCA TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACC CCA CCT GGT GCT CCG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
G17U-siRNA2_mSTAT3	AAG GAC GAC TTT GAT TTC AAC TTT ATT CCA TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGT TGA AAT CAA AGT CGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
G17U-siRNA2_mSTAT5	AAG GCG ACC ATC ATC AGC GAG TTT ATT CCA TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACT CGC TGA TGA TGG TCG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
L1a	CCC TCA CCA CAG CCT TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L1b	CCC TCA CCA CAG CCA TTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L1c	CCC TCA CCA CAG CCA CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L1d	CCC TCA CCA CAG CCT CAC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L2a	CCC TCA CCA CAT CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L2b	CCC TCA CCA TAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L2c	CCC TCA CCT CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L2d	CCC TCA CCT TTT CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L2e	CCC TCA CCA CTG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L3a	CCC TAA CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA

L3c	CCC ATT CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L3d	CCA TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L3e	CCC TCT CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
L3f	CCC ACA CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
16-3A_rev_com	CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA GA
siRNA1_mSTAT3	AAG GGG GCC AGG CCA ACC ACC TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGG TGG TTG GCC TGG CCC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
siRNA1_mSTAT5	AAG GCG GAG CAC CAG GTG GGG TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACC CCA CCT GGT GCT CCG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
siRNA2_mSTAT3	AAG GAC GAC TTT GAT TTC AAC TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA AGT TGA AAT CAA AGT CGT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
siRNA2_mSTAT5	AAG GCG ACC ATC ATC AGC GAG TTT ATT CCC TCA CCA CAG CCT CCC CTA TAA ACT CGC TGA TGA TGG TCG CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC ATT
siRNA_mSTAT3	Santa Cruz Biotechnology: sc-29494
T7 fw Primer mit GG	TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG

3.10. Zelllinien

Die Zelllinie BAF/3 ist eine immortalisierte murine prä-B-Zelllinie, deren Wachstum und Proliferation abhängig von Interleukin-3 ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit der cDNA für gp130 (BAF_gp130) bzw. den cDNAs für gp130 und den IL-6R (BAF_gp130_IL-6R) stabil transfiziert und freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt [129, 134, 135].

4. Methoden

4.1. Analytische Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese ist die wichtigste Methode in der Analyse und zum Nachweis von Nukleinsäuren. Im Unterschied zu Proteinen sind Nukleinsäuren in einem weiten pH-Bereich auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats stets negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Diese Wanderung erfolgt umso schneller, je kleiner die Nukleinsäure-Moleküle sind.

4.1.1. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Reinigung und Analyse einzelsträngiger RNA-Fragmente wurden denaturierende Polyacrylamidgele verschiedener Größe verwendet:

- A klein: 130 mm x 80 mm x 0,75 mm
- B groß: 245 mm x 180 mm x 1,5 mm

Dabei sorgte der Zusatz von Harnstoff für eine Entfaltung der Nukleinsäuren. Die Zusammensetzung der hierfür verwendeten Polyacrylamidgele ist in Tabelle 4.1 dargestellt und richtete sich nach der Größe der Nukleinsäuren (> 25 nt 10%; < 25 nt 15%).

Tabelle 4-1: Zusammensetzung denaturierender Polyacrylamidgele.

Komponente	10%-ige Gele	15%-ige Gele
TAE	1x	1x
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (w/v)	10%	15%
Harnstoff	8 M	8 M
TEMED (v/v)	0,1%	0,1%
APS (w/v)	0,1%	0,1%

Durch die Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) wurde der Polymerisationsvorgang gestartet.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte eine 10-30-minütige Präelektrophorese bei 10-20 Watt unter Verwendung von 1x TAE Puffer (Tabelle 3-1). Anschließend wurden die Probestaschen mit Puffer gespült, um Harnstoffreste aus den

Taschen zu entfernen. Die RNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x RNA-Probenpuffer (Tabelle 3-1) versetzt und für 3 min bei 80°C denaturiert. Das Gel wurde mit den vorbereiteten Proben beladen und die Elektrophorese gestartet.

Die Dauer der Elektrophorese und Wattstärke richtete sich nach der Größe des verwendeten Gels sowie nach der Größe der zu trennenden RNA-Fragmente und betrug gewöhnlich 10-20 min (A, kleines Gel) bzw. 1-3 h (B, großes Gel). Hierbei wurde eine Spannung von 10 Watt (A) bzw. 20 Watt (B) pro eingesetztes Gel angelegt.

4.1.2. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Analyse doppelsträngiger DNA bzw. RNA erfolgte mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung von 1x TAE Puffer (Tabelle 3-1). Es wurden 10%-ige Polyacrylamidgele eingesetzt, denen im Vergleich zu denaturierenden Gelen kein Harnstoff zugesetzt wurde. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/6-Volumen 6x-DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 150 V angelegt.

4.1.3. Detektion von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid

Für die Visualisierung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen wurden diese für ca. 5 min in einem Ethidiumbromidbad (4 µg Ethidiumbromid/ mL 1x TAE) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein kationischer, heterozyklischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher zwischen die Basen von Nukleinsäuren interkaliert. Hierdurch verändert sich das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids. Nach Einwirkung durch ultraviolettes Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm wird die Fluoreszenz stark erhöht und die Nukleinsäuren werden sichtbar.

4.1.4. Detektion von Nukleinsäuren durch UV-Shadowing

Aufgrund ihres hohen Absorptionskoeffizienten bei UV-Licht können Nukleinsäuren alternativ zur Ethidiumbromidfärbung auch mit der Methode des UV-Shadowings sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die präparativen Polyacrylamidgele in Vernichtungsbeutel eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt. Durch aufgestrahltes UV-Licht der Wellenlänge 254 nm erscheinen die Banden als dunkle Schatten, und können auf der Folie markiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten

werden. Um UV-induzierte Schäden zu vermeiden, wurde die Expositionszeit so kurz wie möglich gehalten.

4.1.5. Detektion von Nukleinsäuren durch Autoradiographie

Für die Visualisierung radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen wurden diese in Vernichtungsbeutel eingeschlagen, in eine *Exposure*-Kassette überführt und auf eine PhosphorImager-Platte exponiert. Die Expositionszeit variierte je nach Grad der Markierung zwischen 10 min und 16h. Bei einer längeren Expositionszeit wurden die Gele vor der Exposition durch Anlegen eines Vakuums im Geltrockner DryStar (H. Hölzel, Hörlkofen) für 2-3 h bei 70°C getrocknet. Hierfür wurden die PAA-Gele auf zwei Lagen feuchtem Whatman-Papier positioniert und mit Folie bedeckt. Die Identifizierung und Lokalisation der Nukleinsäuren erfolgte mittels eines PhosphorImagers der Firma BioRad (München) und der Software Quantity One®.

4.1.6. Visualisierung von Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren

Die Detektion von fluoreszierenden Nukleinsäuren erfolgte in denaturierenden PAA-Gelen (4.1.1) mit Hilfe des Fluoreszenzimagers Typhoon 9410 (GE Healthcare, München) bzw. dem Geldokumentationssystem VersaDoc (Biorad, München).

4.1.7. Diffusionselution von RNA aus Polyacrylamidgelen

Die mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (4.1.1) getrennten und mittels UV-*Shadowing* (4.1.4) bzw. Autoradiographie (4.1.5) detektierten Nukleinsäuren konnten mittels Diffusionselution aus dem Gel isoliert werden. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden mit 350 µL RNA-Elutionspuffer (Tabelle 3-1) überschichtet und unter Schütteln (1000 rpm) bei 37°C für 1 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Gelstücke wurden ein zweites Mal mit RNA-Elutionspuffer bedeckt und die Inkubation wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und die RNA mittels Alkoholpräzipitation gefällt (4.1.9).

4.1.8. Phenol-Chloroform-Extraktion

Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit von Nukleinsäuren und Proteinen in einer zweiphasigen Emulsion können Nukleinsäuren aus einer proteinreichen Lösung extrahiert werden. Die RNA-Lösung wurde zunächst auf ein Volumen von 200 µL mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 200 µL Phenol versetzt. Die Probe wurde gut gemischt und anschließend für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 180 µL Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)(v/v) gut durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die darin enthaltene RNA mittels Alkoholpräzipitation (4.1.9) konzentriert.

4.1.9. Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren

Bei der Alkoholpräzipitation für die Konzentrierung von RNA Lösungen wurde zu einem Volumenteil Lösung ein Volumenteil Isopropanol und 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) gegeben und gut durchmischt. Durch Zugabe der Salzlösung (monovalente Kationen) mit leicht saurem pH-Wert wird gewährleistet, dass eine quantitative Fällung der Nukleinsäuren erfolgt, wohingegen der Alkohol bewirkt, dass DNA-/RNA Moleküle dehydratisieren und sich zusammenlagern. Dieser unlösliche Niederschlag aus Nukleinsäuren kann durch anschließende Zentrifugation isoliert werden. Um die Präzipitation kleiner RNA-Fragmente zu verstärken, wurde zusätzlich 1 µL Glykogen (20 mg/mL) zugefügt.

Für die Präzipitation wurde die Nukleinsäurelösung für mindestens 30 min bei -20°C gelagert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit ein- bis zwei Volumeneinheiten 70% Ethanol gewaschen, erneut kurz zentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Die so erhaltene RNA wurde in 20 µL Aqua dest. aufgenommen.

4.1.10. Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen wurden diese photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDropND-1000 (PeqLab, Erlangen) vermessen. Zeitgleich wurde auch die Absorption bei 280 nm und 230 nm bestimmt um nach Bildung des Quotienten E260: E280 bzw. E260: E230 eine Aussage über die Reinheit der Nuklein-

säurelösung treffen zu können. Dabei gelten DNA- und RNA-Lösungen als rein, wenn sie einen E260: E280 –Wert von 1,8-2,0 aufweisen. Es galten dabei folgende Zusammenhänge:

$$1 \text{ OD}_{260} \sim 50 \text{ } \mu\text{g/mL dsDNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \sim 40 \text{ } \mu\text{g/mL ssRNA}$$

4.1.11. Reinigung mittels BioSpin® P6 Säulen

Um Enzyme, Nukleotide und Salze aus 5'- γ ³²P-markierten kommerziell erworbenen Oligos zu entfernen, wurden diese mit Hilfe von BioSpin® P30 Säulen (Biorad, München) gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.2. Präparation und Modifikation von Nukleinsäuren

4.2.1. Hybridisierung von Nukleinsäuren

Um eine doppelsträngige Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase zu schaffen, wurden zu transkribierende Nukleinsäuren mit einem T7-Primer hybridisiert (Tab.4-2)

Tabelle 4-2: Hybridisierung mit T7-Primer.

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
T7-Primer mit GG (100 μ M)	5	5 μ M
rev_komplement_Sequenz_T7 (100 μ M)	5	5 μ M
Hybridisierungspuffer (10x)	10	1x
Aqua dest.	80	

Die Hybridisierungsansätze wurden für 5 min bei 80°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Temperatureinstellung im Thermomixer auf 22°C reduziert und so die Proben langsam (~1 h) auf RT abgekühlt, um eine optimale Anlagerung der Stränge zu gewährleisten.

4.2.2. *In vitro* T7-Transkription

Für die Synthese von einzelsträngiger RNA wurde die rekombinante DNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem T7-Bakteriophagen verwendet. Als DNA-Template dienten die aus den Hybridisierungsansätzen hergestellten Proben.

Tabelle 4-3: Reaktionsansatz einer T7-Transkription.

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
Hybridisierungsansatz	10	0,5 μM
Transkriptionspuffer (3x)	33	1x
NTP-Mix (25 mM)	7,5	1,9 mM
MgOAc (500 mM)	3	15 mM
T7-RNA-Polymerase	4	~ 6 U/mL
Aqua dest.	42,5	

Die *in vitro* T7-Transkriptionsreaktion wurde für mindestens 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss folgte eine analytische bzw. präparative denaturierender PAGE (4.1.1 ff).

4.2.3. T7-Transkription mit Einbau modifizierter Nukleotide

Die T7-Polymerase-Variante T7-Polymerase-Y639F besitzt die Fähigkeit, an Stelle der Nukleotide CTP/ UTP, die modifizierten Nukleotide 2'F-CTP und 2'F-UTP als Substrate zu verwenden und verleiht somit der entstehenden RNA eine erhöhte Stabilität gegenüber einem Abbau durch Ribonukleasen.

Tabelle 4-4: T7-Transkription mit modifizierten Nukleotiden.

Komponente	2'F-CTP	2'F-UTP	2'F-CTP/UTP	Endkonzentration
Hybridisierungsansatz	2 μL	2 μL	2 μL	0,5 μM
Transkriptionspuffer (3x)	6,7 μL	6,7 μL	6,7 μL	1x
ATP (10 mM)	2 μL	2 μL	2 μL	2 mM
GTP (10 mM)	2 μL	2 μL	2 μL	2 mM
2'F-CTP (10 mM)	2 μL	-	2 μL	je 2 mM
2'F-UTP (10 mM)	-	2 μL	2 μL	
UTP (10 mM)	2 μL	-	-	
CTP (10 mM)	-	2 μL	-	
MgOAc (500 mM)	0,6 μL	0,6 μL	0,6 μL	15 mM
T7-Pol.-Y639F	4 μL	4 μL	4 μL	

Die *in vitro* T7-Transkriptionsreaktion wurde für mindestens 4 h bei 37°C intubiert. Im Anschluss folgte eine analytische bzw. präparative denaturierender PAGE (4.1.1 ff).

4.2.4. GTPS-T7-Transkription zur Fluoreszenzmarkierung von RNA

Eine Alternative für den Erwerb Fluoreszenz-markierter RNA ist sich diese selber zu synthetisieren. Als erster Schritt wurde ein DNA-Oligonukleotid für die T7-Bindestelle an die *reverse*-komplementäre Sequenz hybridisiert (4.2.1) und die RNA über *in vitro* T7-Transkription (4.2.2) synthetisiert, wobei GTP durch GTPS bzw. GMPS (2 mM) ersetzt wurde. Die Transkription erfolgte bei 37°C über Nacht und wurde anschließend über eine präparative denaturierende PAGE gereinigt (4.1.1 ff). Die am 5'-Ende GTPS-geprimte RNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 647 C2-Maleimid ÜN bei RT inkubiert.

Tabelle 4-5: Fluoreszenzmarkierung GTPS-geprimter RNA.

Komponente	Menge	Endkonzentration
GTPS-RNA	500 pmol	20 µM
Alexa Fluor® 647 C2-Maleimid (10 mM)	5 µL	2 mM
PBS pH 7,4 (10x)	2,5 µL	1x
Aqua dest.	ad 25 µL	

Um nicht reagiertes Fluorophor zu entfernen, wurde die RNA erneut präparativ gereinigt (4.1.1 ff).

4.2.5. Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Das Enzym FastAP™ *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* katalysiert die Freisetzung der 5'- und 3'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren und Nukleotiden, sowie die Dephosphorylierung von Proteinen. Zur Vorbereitung auf die radioaktive Endmarkierung wurde *in vitro* transkribierte RNA dephosphoryliert.

Tabelle 4-6: Dephosphorylierung von RNA-Fragmenten.

Komponente	Menge	Endkonzentration
RNA	100-200 pmol	2-4 µM
FastAP-Puffer (10x)	5 µL	1x
FastAP™ <i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> (1U/µL)	1 µL	0,02 U/µL
Aqua dest.	ad 50 µL	

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,5 µL EDTA (500 mM) und die Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 75°C. Zur Reinigung der dephosphorylierten RNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (4.1.8) mit anschließender Alkoholpräzipitation (4.1.9) durchgeführt.

4.2.6. Radioaktive 5'-Endmarkierung von RNA

Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) katalysiert die Übertragung der radioaktiv markierten γ - ^{32}P -Phosphatgruppe von ATP auf den 5'-OH Terminus von einzelsträngigen Nukleinsäuren. Der Ansatz zur Herstellung von 5'-endmarkierter RNA ist in Tabelle 4-7 dargestellt.

Tabelle 4-7: Radioaktive Endmarkierung von RNA.

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
ssRNA	3	< 1 µM
PNK-Puffer A (10x)	2	1x
[γ - ^{32}P]-ATP (10 µCi/µL)	1-3	0,5-1,5 µCi/µL
PNK (10 U/µL)	1	0,5 U/µL
Aqua dest.	ad. 20	

Die enzymatische Endmarkierung wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Zur Inaktivierung des Enzyms und gleichzeitigem Schutz der RNA wurden 0,5 µL EDTA (500 mM) hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 5 min bei 70°C inkubiert. Die markierte RNA wurde über ein präparatives denaturierendes PAA-Gel gereinigt (4.1.1 ff).

4.2.7. Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszähler

Zur Messung der Radioaktivität von markierten RNAs wurde ein Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2500 TR, Perkin Elmer, Rodgau) verwendet. Von den mittels PAGE gereinigten Nukleinsäuren wurden je 1 µL mit 50 µL Selektionspuffer (Tabelle 3-1) versetzt und mit 1 mL Szintillation-Lösung Ultima Gold™ (Perkin Elmer, Rodgau) gemischt. Im Flüssigkeitsszintillationszähler wurde das Programm 4 verwendet um die Strahlung von ^{32}P in cpm (*counts per minute*) zu detektieren.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels diskontinuierlicher, denaturierender SDS-PAGE lassen sich Proteine durch den Zusatz von SDS aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte trennen. Hierzu wurden SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli [136] verwendet. Als Puffer wurde 1x SDS-Laufpuffer eingesetzt (3.2). Die Proben wurden mit dem gleichen Volumenanteil 2x SDS-Probenpuffer (3.2) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Um präzipitiertes SDS bzw. Gelreste aus den Taschen zu entfernen, wurden diese vorm Beladen mit Puffer gespült.

Tabelle 4-8: Zusammensetzung des Sammelgels.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	2 mL	4%
Sammelgelpuffer (4x)	3,75 mL	1x
TEMED (v/v)	10 µL	0,07%
APS (w/v) 10%-ige Lösung	100 µL	0,07%
Aqua dest.	ad 15 mL	

Tabelle 4-9: Zusammensetzung des Trenngels.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	10 mL	10%
Trennelgelpuffer (4x)	7,5 mL	1x
TEMED (v/v)	15 µL	0,07%
APS (w/v) 10%-ige Lösung	150 µL	0,07%
Aqua dest.	ad 30 mL	

4.3.2. Nachweis von Proteinen mittels *Coomassie Brilliant Blue*

Zum Anfärben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese für eine Stunde in *Coomassie*-Färbelösung (3.2) auf einem Schüttler inkubiert und anschließend in *Coomassie*-Entfärbelösung transferiert (3.2). Diese wurde mehrfach ausgewechselt, bis der Hintergrund entfärbt war. Grundlage ist die unspezifische Färbung der basischen Seitenketten von Proteinen durch den Triphenylmethanfarbstoff *Coomassie*.

4.3.3. Western-Blot

Beim Western-Blot werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen und durch Immundetektion visualisiert.

Mittels SDS-PAGE (4.3.1) wurden Proteinlösungen zunächst getrennt. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels Elektrophorese in einer Naßblot-Kammer (Hoefer, TE Series) für 1,5 h auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran). Diese wurde zunächst für ca. 2 s in Methanol aktiviert, mit Aqua dest. für 5 min gewaschen und in CAPS Puffer (3.2) äquilibriert. Es wurde ein Sandwich aus zwei Lagen Whatman-Papier, dem SDS-PAA-Gel, der Membran und erneut zwei Lagen Whatman-Papier in einem Sandwichhalter geschichtet und mit CAPS-Puffer (Tabelle 3-2) äquilibriert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Sandwich wandern die Proteine in Richtung Anode und bleiben auf der PVDF-Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen haften.

Die Membran wurde 3x für 5 min in TBST-Puffer (3.2) auf einem Schüttler gewaschen (= Waschschrift). Um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren, wurden freie Bindungsstellen durch eine Inkubation der Membran in einer 0,5%-igen BSA-Lösung (w/v) in 1x TBS blockiert. Die Membran wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben gewaschen und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem Primärantikörper in 1x TBS (3.2) inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 1x TBS unter Schütteln für 45 min. Die Membran wurde 2x für je 5 min in TBST-Puffer (3.2) gewaschen und daraufhin in Western-Blot-Puffer (3.2) für 10 min äquilibriert. Die Detektion erfolgte unter Lichtausschluss und ohne Schütteln in Western-Blot-Puffer mit BCIP und NBT (je 1x) (3.2). Nach Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wurde die Membran in Aqua dest. gewaschen, getrocknet und eingescannt. Die eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 4-10 dargestellt (3.7).

Tabelle 4-10: Antikörper im Western-Blot.

Antikörper	Verdünnung
anti-Aktin	1:1000
anti-pSTAT3	1:1000
anti-pSTAT5	1:1000
anti-rabbit-AP	1:20.000

4.4. Zellbiologische Techniken

4.4.1. Kultivierung von BAF/3-Zellen

Alle zellbiologischen Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Kultivierung erfolgte unter 5% CO₂-Begasung bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Medien und Puffer wurden in steriler Form verwendet.

Die Zellen wurden in der Regel in 25 cm²-Kulturflaschen mit 5 mL DMEM kultiviert. Dem Kulturmedium war 10% FKS (v/v) und 1x Penstrep zugesetzt (Tabelle 3-3). Für das Wachstum und Proliferation von BAF/3 Zellen sind Zytokine essentiell. Die Zelllinie BAF/3_gp130 wurde mit Hyper-IL-6 (10 ng/mL) stimuliert. BAF/3_gp130_IL6R-Zellen wurde das Zytokin IL-6 in einer Konzentration von (10 ng/mL) zugesetzt. Die Zellen wurden maximal bis zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen/mL kultiviert und regelmäßig passagiert. Hierfür wurden einmal wöchentlich die Zellen 5x in 1x-PBS gewaschen und 10-50 µL Zellsuspension in frisches Medium überführt (Passage 1:500-1:100). Die Zentrifugation erfolgte für je 2 min bei 700x g. Als Kontrolle wurden die Zellen auch ohne Zusatz der nötigen Zytokine kultiviert, um die unerwünschte Entstehung Zytokin-unabhängiger Klone zu überwachen.

4.4.2. Kryokonservierung von BAF/3-Zellen

Für die Dauerkonservierung der Zelllinien wurden Kryostocks angefertigt. Zellen aus einer 25 cm²-Kulturflasche mit einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen/mL wurden für 2 min bei 700x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2-3 mL Einfriermedium, DMEM welches mit 20% FKS und 10% DMSO versetzt war, aufgenommen. Die Zellen wurden in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurden sie in eine vorgekühlte Einfrierbox (NALGENE™) überführt und diese in eine -80°C Truhe transferiert. Dauerhaft wurden die Kryostocks in einem flüssigem Stickstofftank gelagert.

4.4.3. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die Eigenschaften vieler Tausend Zellen in kurzer Zeit erfasst werden. Dabei werden die Zellgröße, Zellgranulität und die Zellfärbung analysiert. In dieser Arbeit wurde das Gerät FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe des Vorwärtsstreulichtes (FSC= *forward scatter*) und des seitlich entstehenden Streulichtes (SSC= *side scatter*) eine einheitliche Zellpopulation in einer

Probemessung definiert und ein *Gate* gesetzt. Die Höhe des SSC lag dabei bei ~400. Für die Messung wurden die Proben mit einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm (FL-4) bei einer Laserintensität von 500-700, bzw. bei einer Wellenlänge von 488 nm (FL-1) angeregt. Es wurden je Probe 10.000 Zellen im definierten *Gate* gemessen.

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

4.4.3.1. Nachweis von Membranproteinen bei BAF/3-Zellen

Für den Nachweis des IL-6R bzw. gp130 auf der Oberfläche von BAF/3-Zellen wurden diese mittels Durchflusszytometer analysiert (4.4.3). Je Probe wurden 500.000 Zellen 2x mit je 350 µL 1x PBS (3.2) gewaschen (2 min 700x g Zentrifugation) und die Zellen in 350 µL 1x PBS aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 1 µL Primärantikörper und eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden erneut 2x gewaschen und 1 µL Sekundärantikörper (anti-Maus_APC) (3.7) hinzugefügt. Es wurde abgedunkelt für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen erneut 2x gewaschen. Die Zellen wurden in 350 µL 1x PBS aufgenommen und in Probenröhrchen überführt. Nach Einspannen in den Probenhalter und einer Probemessung wurde die Antikörperbindung analysiert. Es wurden folgende Primärantikörper (3.7) verwendet:

- anti_gp130
- anti_hIL-6R
- anti_Tetra-His

4.4.3.2. Shedding des IL-6-Rezeptors

Die proteolytische Abspaltung des IL-6R von der Zelloberfläche (*Shedding*) wird durch die Enzyme ADAM10 bzw. 17 generiert, welche durch PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) stimuliert werden. Für das *Shedding* wurden BAF/3_gp130_hIL6R Zellen in der Anwesenheit von 100 nM PMA für 2 h im Brutschrank kultiviert. Das PMA (Stock 10 mM) wurde unmittelbar vor dem Versuch frisch angesetzt: 1:10 Verdünnung in DMSO (Dimethylsulfoxid) und daraus eine 1:100 Verdünnung in Medium → 10 µM.

4.4.3.3. Analyse der Aptamerbindung und der Internalisierung

Die Aptamer-Bindung an den nativen IL-6R bzw. die Internalisierung des Aptamers über den membranständigen IL-6-Rezeptor wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von BAF/3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden je Probe 500.000 Zellen 2x mit je 350 µL Selektionspuffer (3.2) gewaschen (Zentrifugation: 2 min 700x g). Zu der Zellsuspension wurde die gelabelte RNA (3.9) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und für 10-30 min auf Eis bzw. bei 37°C inkubiert. Um nicht gebundene RNA zu trennen, folgte ein zweimaliges Waschen mit je 350 µL Selektionspuffer. Die Zellen wurden in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen und analysiert. Optional wurde IL-6 (10 ng/mL) während der Inkubation mit den Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren zugesetzt bzw. schloss sich eine 10-minütige Inkubation der Zellen in 350 µL Trypsin-EDTA bei 37°C an.

4.4.4. Fluoreszenzmikroskopie

In biologischen Objekten ermöglicht ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop (LSM) die Untersuchung von anatomischen bzw. physiologischen Fragestellungen auf subzellulärer, zellulärer und histologischer Ebene unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. In der vorliegenden Arbeit wurde das LSM 510 ConfoCor2 (Zeiss, Jena) verwendet. Die Grundeinstellungen sind in Tabelle 4-11 wiedergegeben.

Tabelle 4-11: Einstellungen am LSM.

	roter Kanal	grüner Kanal
Farbstoffe	Alexa647 Atto647N APC	EGFP
Laser	633 nm	488 nm
Strahlenteiler	HFT 514/633 nm NFT 545	HFT 488
Filter	LP 650 nm	LP 505
Pinhole	92-896 µm	72 µm
Laserstärke	5-15%	3-10%

4.4.4.1. Bindung des Aptamers an den nativen IL-6-Rezeptor und Rezeptor-vermittelte Internalisierung

Für den Nachweis der Aptamerbindung an den nativen IL-6R bzw. die Internalisierung des Aptamers wurden je Probe 500.000 Zellen 2x mit je 350 µL Selektionspuffer (Tabelle 3-1) gewaschen (Zentrifugation: 2 min 700x g). Die Zellen wurden in 350 µL Selektionspuffer aufgenommen und 10 pmol gelabelte RNA hinzugefügt (Tabelle 3-5). Die Probe wurde für 10-30 min bei entsprechender Temperatur abgedunkelt inkubiert, anschließend 2x mit Selektionspuffer gewaschen und final in 20-50 µL Selektionspuffer aufgenommen. Die Probe wurde direkt auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Um die Zellen nicht zu zerdrücken und um den Abstand zwischen Objektträger und Deckgläschen zu erhöhen, wurde zuvor auf den Objektträgern ein Bereich mit einem Stift markiert. Optional schloss sich an die Inkubation mit dem Aptamer eine 10-minütige Inkubation der Zellen in 350 µL Trypsin/EDTA bei 37°C an. Um die Zellen nach erfolgter Aptamer-Aufnahme optional zu Fixieren, wurden sie für 10 min in Histofix-Lösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert.

4.4.4.2. Visualisierung von Proteinen

Für die Detektion membranständiger Proteine war eine Fixierung nicht erforderlich. Es wurden je Probe 500.000 Zellen 2x mit je 350 µL 1x PBS (Tabelle 3-1) gewaschen (2 min 700x g Zentrifugation) und die Zellen in 350 µL 1x PBS aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 1 µL Primärantikörper und eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden erneut 2x gewaschen und 1 µL Sekundärantikörper (3.7) (anti-Maus_APC) hinzugefügt. Es wurde abgedunkelt für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen 2x gewaschen. Die Präparation der Objektträger erfolgte analog nach 4.4.4.1. Es wurden folgende Primärantikörper (3.7) verwendet:

- anti_gp130
- anti_hIL-6R
- anti_Tetra-His

4.4.5. Proliferationsassay

Für die Messung von zytotoxischen Einflüssen wurde das alamarBlue® Reagenz (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Der enthaltene Redox-Farbstoff Resazurin wird dabei von metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und zum pinken Fluoreszenzfarbstoff Resorufin reduziert. Die Fluoreszenzintensität gibt somit ein Maß für die Zellvitalität.

Die zu untersuchenden BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen wurden 2x in 1x PBS (Tabelle 3-2) gewaschen. Es wurden je 50.000 Zellen in ein Well einer 96-Well Platte in 100 µL DMEM ohne FKS ausgesät. Um die zytotoxischen Einflüsse des Aptamers zu untersuchen, wurde IL-6 mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL dazu pipettiert und die entsprechende Menge an RNA hinzugefügt. Als Kontrolle wurde das Zellgift Cycloheximid (10 µg/mL) verwendet. Zur Klärung der Frage, ob das Aptamer mSTAT3 phosphorylieren kann, wurde nach intensivem Waschen der Zellen (5x), zum Teil auf ein Zytokin verzichtet. Nach 2 h Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde FKS zu einer finalen Konzentration von 10% hinzugefügt und die Zellen für 48 h inkubiert. Es wurden 10 µL des alamarBlue®-Reagenzes dazu pipettiert und weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am SpectraMax M2 (Molecular Devices, Ismaning) unter Verwendung von Fluotrac600 96-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Es wurde bei 570 nm Anregung und 585 nm Emission gemessen.

4.4.6. Transfektion von BAF/3-Zellen

Die Transfektion der murinen prä-B-Zelllinie BAF/3_gp130_hIL6R erfolgte mit der Nucleofactor®Technologie von Amaxa (Lonza, Köln). Hierfür wurde das Zelllinien-spezifische Kit V (3.6) mit dem Nucleofector® Device II verwendet. Das Transfektionsgerät wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kreienkamp (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Durchführung erfolgte im Allgemeinen nach Herstellerangaben. Für die Transfektion zum Knockdown von mSTAT3 wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion durch 5-maliges Waschen von IL-6 befreit und die Zellen ÜN in Zellkulturmedium mit IL-3 (10 ng/mL) inkubiert. Für die Transfektion von Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT5 wurde auf diesen Schritt verzichtet. Je Transfektionsansatz wurden 2×10^6 gewaschene Zellen verwendet. Dabei wurden nach der Transfektion die Zellen auf ~ 600.000/Well auf drei Wells (24-Well-Platte) verteilt, um unterschiedliche Zeitpunkte post Transfektion analysieren zu können. Dem

Zellkulturmedium wurde sowohl IL-6 als auch IL-3 (3.8) mit einer Endkonzentration von 10 ng/mL zugesetzt. Für die Analyse des Proteingehaltes an phosphoryliertem mSTAT3/5 wurden die Zellen nach 6-48 h post Transfektion geerntet und die Zellen aus einem Well in 100 µL 2x-SDS-Probenpuffer (3.2) aufgenommen. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde weiterhin der im Kit enthaltene Vektor pmaxGFP (2 µg) eingesetzt und die Produktion von GFP (grün fluoreszierendes Protein) 24 h nach Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie (4.4.4.2) untersucht.

4.4.7. Rezeptor-vermittelte Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären zur Verminderung der Produktion von mSTAT3 und mSTAT5

Für die Rezeptor-vermittelte Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären wurden je Ansatz 200.000 BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen 2x in 500 µL 1x PBS (Tabelle 3-1) gewaschen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h der Zellen in Selektionspuffer und 65 nM der jeweiligen RNA-Probe. Die Zellen wurden für 2 min bei 700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension in 500 µL Medium ohne FKS folgte eine zweite Inkubationseinheit mit 65 nM der RNAs. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät und FKS mit einer finalen Konzentration von 10% zugefügt. Nach 48h Inkubation im Zellkulturinkubator wurden die Zellen aus einem Well in 100 µL 2x-SDS-Probenpuffer (3.2) aufgenommen. Die Produktion von murinem pSTAT3/5 wurde mittels Western-Blot-Analyse detektiert(4.3.3).

4.5. Charakterisierung und Analyse der Aptamer-Protein-Interaktion

4.5.1. Filterbindungsstudien

Die Wechselwirkung zwischen Aptamer und Protein wurde mittels radioaktiver Filterbindungsstudien analysiert. Dabei wurde jeweils eine konstante Menge (< 2 nM) radioaktiv markierter RNA mit steigenden Proteinkonzentrationen (0-500 nM) in 25 µL Selektionspuffer (3.2) für 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde eine Nitrozellulosemembran für 30 min bei RT in Aminohexansäure-Puffer (3.2) äquilibriert. Die Membran wurde mit Selektionspuffer gewaschen und in eine 96-Well-Dot Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel) eingespannt. Nach Anlegen eines Vakuums wurde jedes Well zweimal mit 200 µL 1x Selektionspuffer gewaschen. Die Proben (je 20 µL) wurden über die

Nitrozellulosemembran filtriert. Dabei bleiben Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haften. Nicht an Proteine gebundene Nukleinsäuren wurden durch 4-maliges Waschen mit je 200 µL Selektionspuffer pro Well entfernt. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und eine 100-200%-Kontrolle für jede Probe in 2- bis 3-facher Ausführung (je 2 µL) auf die Membran pipettiert. Mittels Autoradiographie (4.1.5) wurde die auf der Membran haftende RNA detektiert und mittels der Software QuantityOne® quantifiziert. Für die Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_d) und Bindungskurven wurde die Software GraphPad Prism4® genutzt. Dabei wurden die Daten unter Verwendung eines *one-site-binding* Modells (hyperbol) gefittet. Die Dissoziationskonstanten ergaben sich aus folgender Gleichung, wobei $B_{\max}$ den maximal möglichen Anteil gebundener RNA darstellt.

$$\% - \text{Bindung} = \frac{B_{\max} \times c [\text{Protein}]}{(K_d + c [\text{Protein}])}$$

4.5.2. Sekundärstrukturvorhersage von Nukleinsäuren

Einzelsträngige Nukleinsäuren nehmen eine von ihrer Sequenz und Umgebungsbedingungen abhängige gefaltete Struktur an. Auf der Grundlage des von M. Zuker entwickelten Algorithmus [137] werden Vorschläge für die vorliegenden Strukturen berechnet. Hierfür wurden die zu untersuchenden Sequenzen auf dem *Mfold server* [138] in eine entsprechende Maske eingetragen und die Strukturen online berechnet.

4.5.3. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Mittels der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) können Interaktionen unmarkierter Moleküle in Echtzeit analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das SPR-2 System (SierraSensor, Hamburg) verwendet. Ein aufgenommenes Sensogramm zeigt die Assoziation und Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes auf einer Sensoroberfläche.

Bei der Oberflächenplasmonresonanz wird polarisiertes und monochromatisches Licht auf eine dünne Goldschicht gestrahlt, an der es zur Totalreflexion kommt. Die Goldschicht befindet sich auf einem Glasprisma. Das Licht kann nun mit den freien Elektronen der Goldschicht interagieren, die ein sogenanntes „Elektronenplasmon“ ausbilden. Kommt es zu

dieser Resonanz, tritt im reflektierten Licht eine Energielücke auf, die einen ganz bestimmten Winkel I aufweist. Die Resonanz und damit der Winkel I ist direkt proportional zum Beladungsgrad der Goldoberfläche.

Für die Analyse der Protein-Aptamer-Wechselwirkung wurde als ein Interaktionspartner Hyper-IL-6 auf einen Sensor-Chip immobilisiert. Als Referenzprotein wurde IL-6 verwendet (3.8). In einem Flusssystem wurde das zu untersuchende Aptamer als möglicher Ligand in Selektionspuffer (Tabelle 3-1) über den Chip geleitet. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem immobilisierten Protein und dem Aptamer, erhöht sich der Beladungsgrad bzw. die Schichtdicke an der Goldoberfläche, was zu einem veränderten Winkel II führt. Die Signalstärke ist dabei proportional zur gebundenen Masse und wird in Resonanz-Einheiten (RU) ausgedrückt, wobei 1 RU der Masse von 1 pg/mm^2 entspricht.

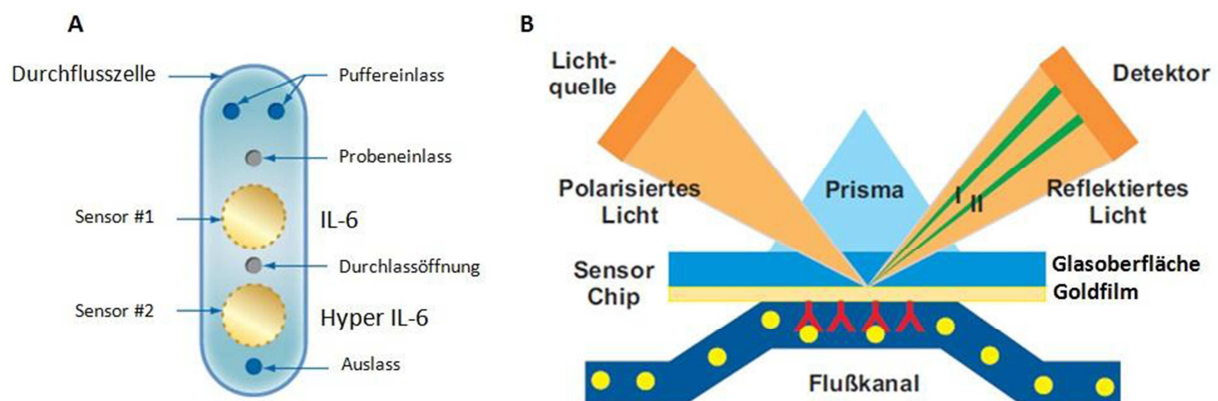


Abbildung 4-1 Oberflächenplasmonresonanz.

(A) Aufbau einer Durchflusszelle: Ein Sensorchip besteht aus einer Glasoberfläche, welche mit einem Goldfilm überzogen und mit einer funktionellen Interaktionsschicht versehen ist. Eine Immobilisierung von Biomolekülen in nicht-denaturierter Form kann hierdurch realisiert werden. Der Sensorchip ist in einer Durchflusszelle eingebracht. Im ersten Sensorbereich der Durchflusszelle wurde das Referenzprotein IL-6, im zweiten Bereich das Zielprotein Hyper-IL-6 immobilisiert. **(B)** Schematischer Aufbau: Polarisiertes Licht wird von der Goldoberfläche eines Sensorchips total reflektiert und erzeugt in der Goldschicht Plasmonresonanz, welche proportional zur gebundenen Masse an der Chipunterseite ist [139].

4.5.3.1. Belegung des Sensor-Chips

Die Immobilisierung der Proteine Hyper-IL-6 und IL-6 erfolgte über eine Crosslink-Reaktion der aktivierten Carboxylatoberfläche des Sensor-Chips mit primären Amingruppen der Proteine. Hierfür wurde die Chipoberfläche durch eine 8-minütige Injektion eines Gemisches aus 400 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und 100 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert. Auf Sensor 1 der Flusszelle wurde IL-6 durch eine 8-minütige Injektion einer 10 $\mu\text{g/mL}$ IL-6-Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) bei einer Flussrate von

25 $\mu\text{L}/\text{min}$ immobilisiert. Auf dieselbe Weise wurde Sensor 2 der Flusszelle mit Hyper-IL-6 belegt. Freie Bindungsstellen auf dem Sensor-Chip wurden mit einer Ethanolaminlösung (1 M, pH 8,5) für 6 min blockiert. Als Laufpuffer diente Selektionspuffer (Tabelle 3-1) unter Zusatz von 0,01% Tween20.

4.5.3.2. Messung der Aptamer-Protein-Interaktion

Die Messung der Oberflächenplasmonresonanz erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung von Selektionspuffer (+ 0,01% Tween20) und einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Je Probe wurden 150 μL mit der jeweiligen Aptamerkonzentration vorbereitet und ein Volumen von 50 μL in das System injiziert. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 180 s beobachtet. Noch gebundenes Aptamer wurde mit der Injektion von 20 μL HCL (100 mM) gefolgt von 400 s Pufferlauf und einer zweiten Injektion von 10 μL HCL (100 mM) eluiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software TraceDrawer (SierraSensors, Hamburg) wobei die Ergebnisse global durch einen Langmuir 1:1 Bindungsmodell gefittet wurden. IL-6 wurde dabei als Hintergrund-Wert verwendet, um unspezifische Bindung vom Brutto-Signal zu subtrahieren.

4.5.4. Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären mittels Dicer

Die präparierten und radioaktiv markierten RNAs wurden in geringer Konzentration ($< 1 \text{ nM}$) mit dem rekombinanten Enzym hDicer (3.4) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Als Vergleich wurden ebenfalls Proben ohne Zugabe des Enzyms angesetzt, hier wurde stattdessen Aqua dest. hinzugefügt. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Proben 1:1 mit 2x RNA-Probenpuffer (3.2) versetzt und je 10 μL der Proben auf ein 15%-iges denaturierendes PAA-Gel (4.1.1) aufgetragen. Dieses wurde nach der Elektrophorese mit einem Gelrockner (Hölzel, Wörth) dehydriert und die Banden mittels Autoradiographie (4.1.5) detektiert.

Tabelle 4-12: Pipettierschema Dicing-Assay.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNA	1-2 μL	$< 2 \text{ nM}$
Dicer-Puffer (10x)	1 μL	1x
MgCl_2 (50 mM)	0,5 μL	2,5 mM
hDicer (1 U/ μL)	1 μL	1 U
Aqua dest.	ad 10 μL	

5. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das von Dr. Cindy Meyer [6] selektierte RNA-Aptamer 16-3A mit Spezifität für den humanen IL-6-Rezeptor näher zu charakterisieren. Bei diesem 19 nt kurzen Aptamer handelt es sich um eine verkürzte Version des ursprünglich selektierten Aptamers 16-3. Dieses bindet den rekombinant hergestellten löslichen IL-6R hoch spezifisch und affin, charakterisiert durch eine Dissoziationskonstante von etwa 20 nM. In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die an der Interaktion zum IL-6R beteiligten Basen identifiziert werden. Dazu sollten verschiedene Punktvarianten des Aptamers 16-3A erzeugt und auf deren Bindung zum sIL-6R hin untersucht werden. Des Weiteren sollte die Bindung der RNA-Aptamere an den nativen IL-6R auf der Oberfläche von Zielzellen analysiert werden. Als weitere Aufgabe sollte geklärt werden, inwieweit sich das Aptamer als funktionales Werkzeug zur Zelltyp-spezifischen Aufnahme von Wirkstoffen instrumentalisieren lässt.

5.1. Mutationsanalyse der Loopregionen

Für die Bindungsspezifität von G-Quadruplex-enthaltenden Aptameren an ihr Target sind die Basen in den Loopregionen von maßgeblicher Bedeutung. Folglich sollte der Einfluss von Mutationen in den prognostizierten Loopregionen des G-Quadruplexes des Aptamers 16-3A untersucht werden. Der Einfluss einzelner Punktvarianten im Bereich der G-Quadruplex-ausbildenden Guanine sowie ein Richtwert für die Dissoziationskonstante des Aptamers 16-3A wurden bereits in der Doktorarbeit von Dr. Cindy Meyer analysiert [6]. Ein Überblick über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Punktvarianten ist in nachstehender Tabelle wiedergegeben (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Überblick der untersuchten Punktvarianten in den postulierten Loopregionen des Aptamers 16-3A.

Name der reversen-komplementären DNA	Punktvariante	Sequenz nach T7-Transkription
16-3A	/	GGG GAG GCU GUG GUG AGG G Loop 1 Loop 2 Loop3
L1a	G4A	GGG A AG GCU GUG GUG AGG G
L1c	A5U	GGG U G GCU GUG GUG AGG G
L1d	G3U	GG U GAG GCU GUG GUG AGG G
L2a	C8A	GGG GAG A U GUG GUG AGG G

L2b	G10A	GGG GAG GCU AUG GUG AGG G
L2c	U11A	GGG GAG GCU GAG GUG AGG G
L2e	U9A	GGG GAG GCA A GUG GUG AGG G
L3a	G15U	GGG GAG GCU GUG GU U AGG G
L3d	G17U	GGG GAG GCU GUG GUG AUG G
L3e	U14A	GGG GAG GCU GUG GAG AGG G
L3f	A16U	GGG GAG GCU GUG GUG UGG G

Zur Herstellung des RNA-Aptamers 16-3A und davon abgeleiteter Punktvarianten mittels *in vitro* T7-Transkription wurden die *reversen*-komplementären DNA-Sequenzen, welche zusätzlich die Sequenz für den Promotor der T7-RNA-Polymerase beinhalteten, kommerziell erworben (Tabelle 3-6). Im ersten Schritt wurde an dessen 3'-Ende ein DNA-Oligonukleotid mit der T7-Bindestelle hybridisiert (4.2.1).

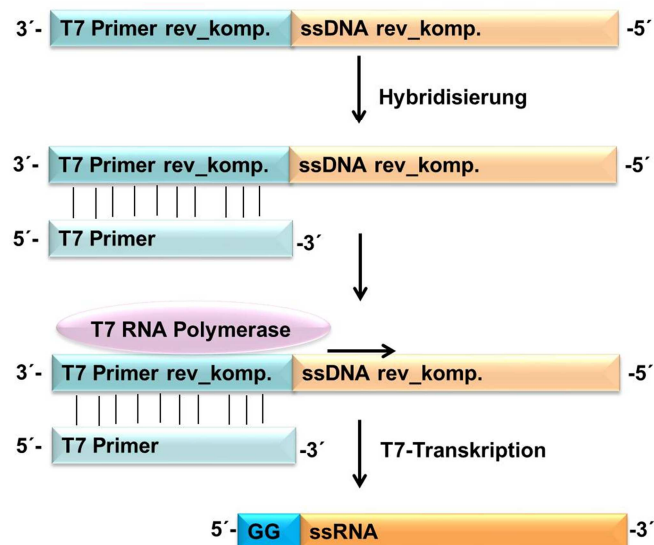


Abbildung 5-1: Hybridisierung des T7-Promotors und *in vitro* T7-Transkription.

Schematische Darstellung des Versuchablaufs. An das 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz wird ein Oligonukleotid mit der Bindestelle für die T7-RNA-Polymerase hybridisiert. Im Anschluss kann die Transkription erfolgen.

Der Erfolg der Hybridisierung wurde in einem nativen PAA-Gel überprüft (4.1.2). Dargestellt ist exemplarisch ein Kontrollgel für die Proben des Loops 1 (Abbildung 5-2).

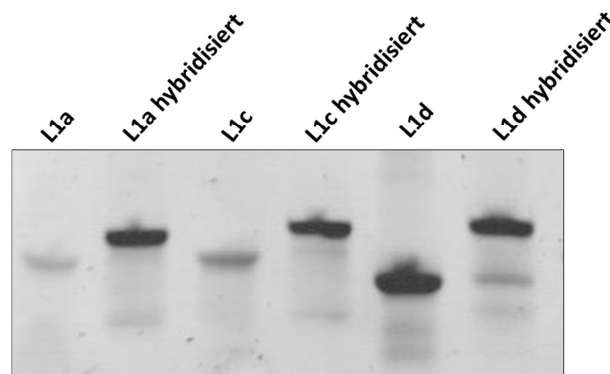


Abbildung 5-2: Kontrollgel der Hybridisierung des T7-Oligonukleotides für die Produktion der drei Varianten des Loops 1.
Auf einem 15%-igem nativen PAA-Gel wurden je 3 μ L aus einem Hybridisierungsansatz sowie 0,5 μ L der entsprechenden ssDNA-Oligonukleotide aufgetragen und getrennt. DNA-Banden wurden mittels Ethidiumbromid gefärbt und durch Anregung mit UV-Licht visualisiert.

Es wurde ein 15%-iges natives PAA-Gel wie beschrieben angefertigt (4.1.2) und mit den Proben beladen. Nach Trennung der Nukleinsäuren wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die entsprechenden Banden durch Anregung mit UV-Licht detektiert (4.1.3). Eine vollständige Hybridisierung äußerte sich in einem deutlichem Gel-Shift in allen hybridisierten Proben im Vergleich zu den einzelsträngigen Ausgangs-Oligonukleotiden (Abbildung 5-2).

Nach erfolgter Hybridisierung der Proben konnte eine *in vitro* T7-Transkription zur Synthese der entsprechenden RNA-Sequenz erfolgen (4.2.2). Die Transkriptionsansätze wurden mittels präparativer, denaturierender PAGE getrennt (4.1.1). Die entsprechenden Banden wurden mittels UV-Shadowing visualisiert (4.1.4) und ausgeschnitten. Die Nukleinsäuren wurden über Diffusionselution aus dem Gel eluiert (4.1.7) und mittels Isopropanol (4.1.9) präzipitiert. Die Konzentration der fertig präparierten RNAs wurde über Absorptionsmessung bestimmt (4.1.10) und die Qualität der RNAs in einem denaturierenden PAA-Gel überprüft. Exemplarisch ist in Abbildung 5-3 ein Kontrollgel für die drei Varianten des Loops 1 sowie für die Punktvariante G17U, welche im Loop 3 lokalisiert ist, dargestellt. Zur Kontrolle wurden stets die RNAs mittels NaOH hydrolytisch gespalten, um den RNA-Gehalt der Proben sicher zu stellen (nicht gezeigt).

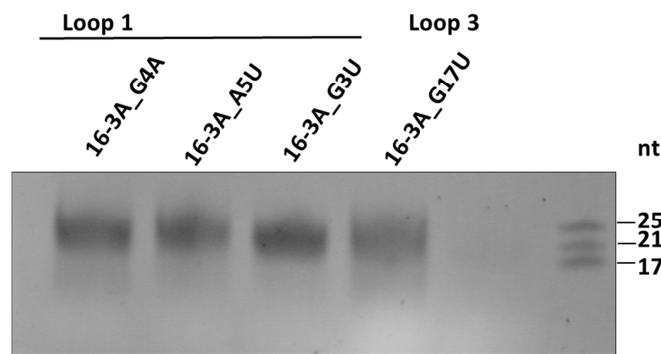


Abbildung 5-3: Kontrolle der präparierten Loopvarianten mittels denaturierender PAGE.

Nach erfolgter Transkription wurden die erhaltenen RNAs: 16-3A_G4A; 16-3A_A5U; 16-3A_G3U und 16-3A_G17U über präparative PAGE gereinigt und die fertigen Aptamer-Varianten final über ein 15%-iges PAA-Gel (denaturierend) überprüft. Als Standard diente ein Gemisch aus drei RNAs mit definierter Länge (17, 21 und 25 nt). Dabei wurden die entsprechenden Banden mittels Ethidiumbromid visualisiert.

5.1.1. Filterbindungsstudien

In analytischen Filterbindungsstudien unter radioaktiven Bedingungen (4.5.1) sollte die Frage geklärt werden, inwiefern sich der Austausch einzelner Basen in der Sequenz des Aptamers 16-3A auf die Affinität zum Zielprotein Hyper-IL-6 auswirkt. Bei Hyper-IL-6 handelt es sich um ein Designer-Zytokin, das aus dem sIL-6R und IL-6 besteht und kovalent über einen kurzen Peptid-Linker miteinander verknüpft ist (Abbildung 1-13).

Zur Vorbereitung auf die radioaktive Endmarkierung war es notwendig, die endständige Phosphatgruppe am 5'-Ende zu entfernen. Nach erfolgter Dephosphorylierung (4.2.5) wurden die Proben über Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (4.1.8) und gefällt (4.1.9). Die erhaltenen RNAs konnten mit γ - ^{32}P unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) endständig markiert werden (4.2.6). Nach präparativer Gelreinigung (4.1.1 ff) wurden die Proben zur Kontrolle erneut über ein 15%-iges denaturierende PAA-Gel getrennt. Die Effizienz der Radioaktivmarkierung einzelner RNAs wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert (4.2.7).

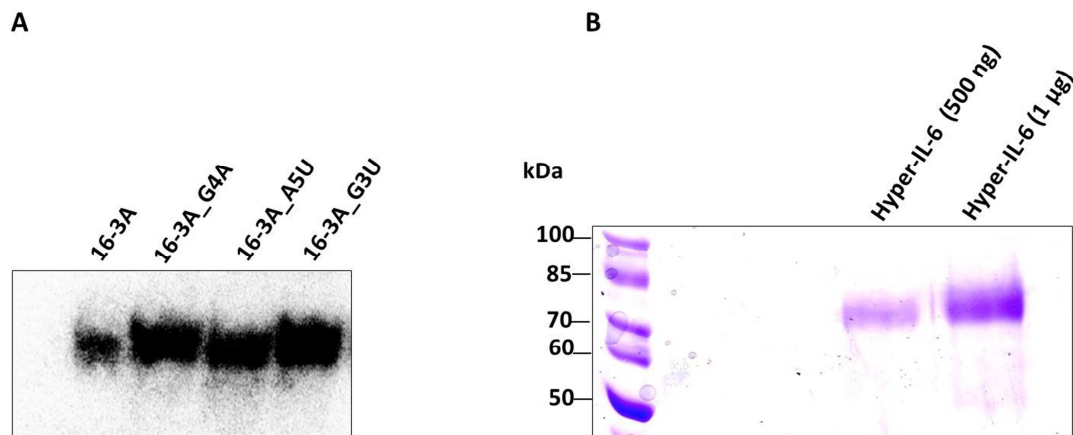


Abbildung 5-4: PAA-Kontrollgel der radioaktiven Markierung des RNA-Aptamers 16-3A und davon abgeleiteter Punktvarianten (G4A, A5U und G3U). SDS-PAA-Gel des Proteins Hyper-IL-6.

(A) Mittels *in vitro* T7-Transkription produziertes Aptamers 16-3A und davon abgeleitete Varianten des Loops 1 wurden am 5'-Ende mit ^{32}P markiert und präparativ gereinigt. Die markierten Proben wurden abschließend mittels 15%-iger denaturierender PAGE kontrolliert. Als Größenmarker wurde kommerziell erworbenes Aptamer 16-3A (ebenfalls endmarkiert) aufgetragen. **(B)** Analyse der Reinheit des Zielproteins Hyper-IL-6 mittels SDS-PAGE (10%-iges Gel) und folgender *Coomassie*-Färbung. Als Proben wurden 500 ng bzw. 1 µg des Proteins HIL-6 aus zwei unterschiedlichen Chargen aufgetragen.

Abbildung 5-4 A zeigt exemplarisch eines der erhaltenen Kontrollgele der am 5'-Ende mit ^{32}P -markierten Varianten des Aptamers 16-3A. Dargestellt sind die erfolgreich markierten und gereinigten Varianten des Loops 1. Als Zielprotein in den Bindungsstudien wurde das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 verwendet. Dieses aus 510 AS bestehende Protein wurde in CHO-Zellen produziert und ist durch vielfache Glykosylierungen gekennzeichnet, was zu einer Vergrößerung des Molekulargewichtes auf ~80 kDa führt. Das Protein wurde von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt und anhand einer SDS-PAGE überprüft. Mittels *Coomassie*-Färbung konnte die erwartete Bande auf Höhe von ~80 kDa detektiert werden (Abbildung 5-4 B).

Zum Nachweis einer Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und dem RNA-Aptamer 16-3A bzw. davon abgeleiteten Loopvarianten wurden analytische Filterbindungsstudien unter radioaktiven Bedingungen durchgeführt (4.5.1). Die markierten RNAs (< 2 nM) wurden mit steigenden Konzentrationen des Proteins Hyper-IL-6 (0-500 nM) inkubiert und die Reaktionsansätze über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Proteine binden dabei unspezifisch an die Nitrozellulosemembran. Findet eine Bindung von Nukleinsäure und Protein statt, verbleibt auch die RNA an der Oberfläche und kann detektiert werden. Nach stringenter Waschen der Membran wurde eine 100-200%-Kontrolle in zweifacher Ausführung auf die Membran pipettiert. Die verbliebene Radioaktivität wurde detektiert (4.1.5) und mittels QuantityOne® quantifiziert.

Zur Sicherstellung der Versuchsdurchführung wurde in jeder Filterbindungsstudie das ursprüngliche Aptamer 16-3A als Positiv-Kontrolle eingesetzt. In Abbildung 5-5 ist beispielhaft eine Bindungsstudie für das Aptamer 16-3A und die drei Varianten des Loops 1 (G4A, A5U und G3U) dargestellt.

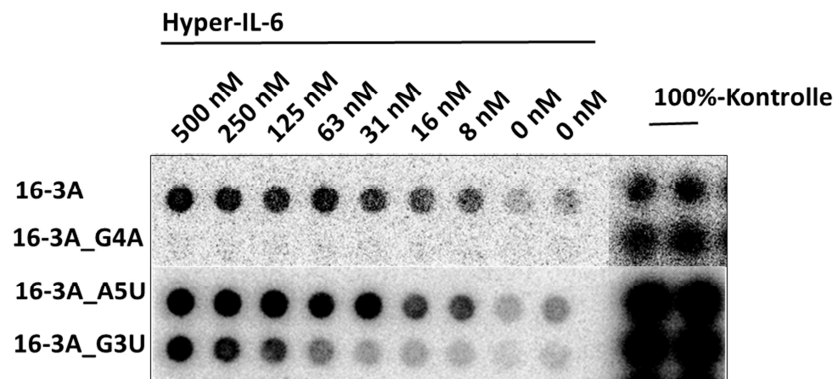


Abbildung 5-5: Analyse der Interaktion zwischen dem Protein Hyper-IL-6 und dem RNA-Aptamer 16-3A und drei davon abgeleiteten Varianten des Loops 1 (G4A, A5U und G3U) mittels Filterbindungsstudie.

Für die Bindungsstudie wurde das Zielprotein Hyper-IL-6 in steigender Konzentration (0-500 nM) mit der jeweiligen radioaktiv markierten RNA (< 2 nM) in Selektionspuffer inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Am Filter verbliebene Mengen radioaktiv markierter RNA wurden autoradiographisch detektiert.

Eine deutliche Bindung der RNAs 16-3, _A5U und _G3U an das Protein Hyper-IL-6 war jeweils durch eine steigende Schwärzung der Filtermembran bei steigender Proteinkonzentration gekennzeichnet. Mit Hilfe der 100%-Kontrollen konnte für jede RNA der Anteil an das Protein gebundener RNA berechnet werden. Die Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism® (Abbildung 5-6).

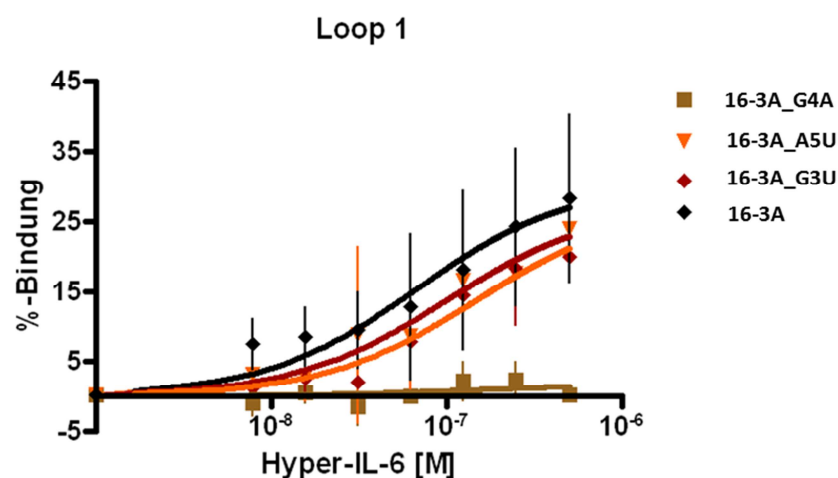


Abbildung 5-6: Graphische Auswertung der analytischen Filterbindungsstudie zum Nachweis der Interaktion zwischen Aptamer 16-3A und der Varianten des Loops 1 (G4A, A5U und G3U).

Der Anteil der prozentualen Bindung der RNA wurde gegen die Proteinkonzentration von Hyper-IL6 aufgetragen und mittels eines *one-to-one* Bindungsmodells gefittet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen.

Die Filterbindungsstudien zeigten, dass der Austausch von Adenin an Position 5 (16-3A_A5U) bzw. Guanin an Position 3 (16-3A_G3U) keine Auswirkung auf die Affinität des RNA-Aptamers zum Protein HIL-6 hat. Im Vergleich dazu führte der Austausch des Guanins an Position 4 (16-3A_G4U) zu einem vollständigen Verlust der Bindung. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach einem Fit der Daten nach einem 1:1-Bindungsmodell. Somit konnten K_d -Werte von $146,2 \pm 4,8$ nM (16-3A_G3U) und $99,6 \pm 27,3$ nM (16-3A_A5U) bestimmt werden. Diese lagen in derselben Größenordnung wie die Dissoziationskonstante für das ursprüngliche Aptamer 16-3A, dessen K_d -Wert mit $66,6 \pm 21,7$ nM berechnet werden konnte (Tabelle 5-2). Bei diesem handelte es sich um kommerziell erworbene RNA, welche radioaktiv markiert wurde, im Gegensatz zu den durch *in vitro* T7-Transkription produzierten Punktvarianten. Der Anteil der maximalen Bindung lag ebenfalls in einer vergleichbaren Größenordnung von ~30%.

Folgend wurde die zweite Loopregion des vorhergesagten G-Quadruplexes untersucht, wobei alle vier der dort liegenden Basen einzeln ausgetauscht wurden. Die Proben wurden mittels Filterbindungsanalyse analysiert (Abbildung 5-7).

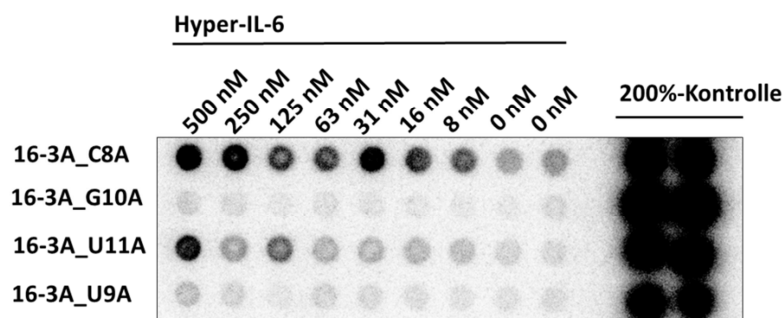


Abbildung 5-7: Analyse der Interaktion zwischen Hyper-IL-6 und verschiedenen Punktvarianten der Loop 2-Region des Aptamers 16-3A (C8A, G10A, U11A und U9A) mittels Filterbindungsstudie.

In der Filterbindungsstudie wurden radioaktiv markierte Punktvarianten des RNA-Aptamers 16-3A (< 2 nM) mit steigenden Konzentrationen des Zielproteins HIL-6 (0-500 nM) in Selektionspuffer inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Dargestellt ist ein Beispiel der mittels Autoradiographie detektierten, auf der Membran verbliebenen, RNA.

Wie anhand von Abbildung 5-7 ersichtlich, konnte eine deutliche Wechselwirkung zwischen dem Aptamer 16-3A_C8A und dem Protein Hyper-IL6 beobachtet werden. Auch die Punktvariante U11A führte nicht zu einem Verlust der Bindungseigenschaft. Hingegen zeigten die beiden Mutanten G10A sowie U9A keine Interaktion mit dem Zielprotein. Die Schwärzung auf der Membran wurde erneut quantifiziert und graphisch dargestellt (Abbildung 5-8).

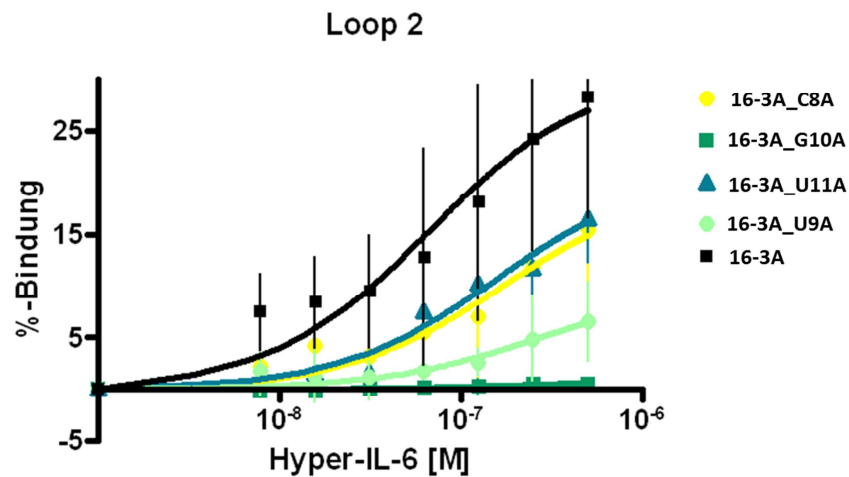


Abbildung 5-8: Graphische Auswertung der Ergebnisse aus analytischen Filterbindungsstudien zum Nachweis der Interaktion zwischen dem Aptamer 16-3A und der Loopvarianten des Loops 2 (C8A, G10A, U11A und U9A).

Die Mittelwerte der prozentualen Anteile der Bindung, welche aus mindestens drei Filterbindungsstudien erhalten wurden, wurden gegen die eingesetzte Menge des Zielproteins Hyper-IL-6 aufgetragen und mit einem *one-to-one*-Bindungsmodell gefittet.

Wie auch für die Loop 1-Region zeigte sich für einzelne Punktvarianten des Aptamers eine konzentrationsabhängige Bindung an das Protein HIL-6. Durch das Fitten der Daten nach einem 1:1-Bindungsmodell konnten für die Punktvariante 16-3A_U11A ein K_d -Wert von $156 \pm 46,0$ nM und für die Punktvariante 16-3A_C8A ein K_d -Wert von $169,1 \pm 63,2$ nM berechnet werden. Der Austausch von Uracil zu Adenin an Position 9 (16-3A_U9A) führte in den Filterbindungsstudien zu einer geringfügigen Bindung. Insgesamt lag der Anteil der maximalen Bindung bei 16-3A_C8A/U11A niedriger als beim Ausgangsaptamer 16-3A und auch die bestimmten K_d -Werte waren um den Faktor 2 erhöht (Tabelle 5-2).

In der Loopregion zwischen dem dritten und vierten Guanin-Triplett sind vier Basen in der propagierten Loopregion lokalisiert. Auch in diesem Fall wurden Purine gegen Pyrimidine ausgetauscht, die über T7-Transkription produzierten RNAs radioaktiv markiert und Filterbindungsstudien mit dem Protein Hyper-IL-6 unterzogen.

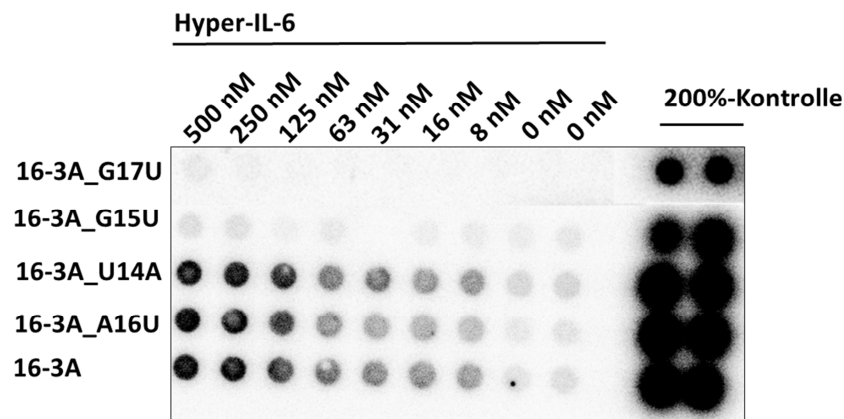


Abbildung 5-9: Filterbindungsstudie für Mutationsanalysen im Loop 3 des Aptamer 16-3A (G17U, G15U, U14A und A16U). Die radioaktiv markierte RNA (< 2 nM) wurde mit steigenden Konzentrationen (0-500 nM) des Zielproteins Hyper-IL-6 in Selektionspuffer inkubiert und einer Filterbindungsstudie unterzogen. Lediglich bei den Mutanten U14A und A16U sowie dem Ausgangsaptamer 16-3A zeigte sich eine spezifische Schwärzung der Membran detektiert mittels Autoradiographie.

Wie in Abbildung 5-9 gezeigt, führte der Austausch der Guanine in der Loopregion 3 (G17U und G15U) zu einem Verlust der Bindung. Die gelabelte RNA dieser Punktvarianten wurde durch die Waschschrte von der Membran gewaschen. Die Punktvarianten 16-3A_U14A und 16-3A_A16U hingegen blieben wie auch das ursprüngliche Aptamer durch die Bindung an Hyper-IL-6 auf der Membran haften und konnten mittels Autoradiographie visualisiert werden. Mit Hilfe der 200%-Kontrollen wurde der prozentuale Anteil der Bindung berechnet und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abbildung 5-10).

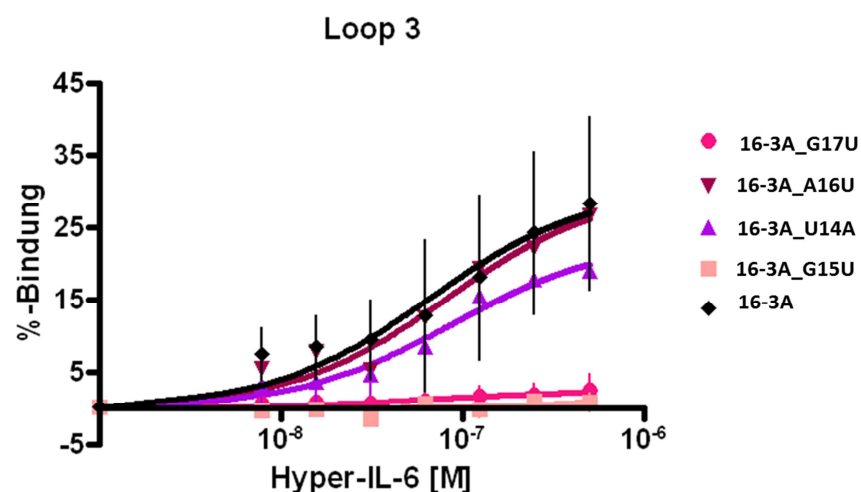


Abbildung 5-10: Graphische Auswertung des Filterbindungstests der Loopvarianten 3.

Der Anteil der prozentualen Bindung der RNA wurde gegen die Proteinkonzentration von Hyper-IL6 aufgetragen und mittels eines *one-to-one* Bindungsmodells gefittet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen.

Wie in Abbildung 5-10 zu sehen, zeigten die Loopvarianten 16-3A_A16U /U14A vergleichbare Bindungseigenschaften für das Protein Hyper-IL-6 wie das unveränderte Aptamer 16-3A. Der Verlust von Guanin führte hingegen zu einem völligen Ausfall der Bindungseigenschaft.

Für die Varianten des Loops 3 konnten K_d -Werte von $82,9 \pm 23,9$ nM (16-3A_A16U) und $89,4 \pm 19,6$ nM (16-3A_U14A) ermittelt werden. Der Anteil der maximalen Bindung lag jeweils, wie auch beim Aptamer 16-3A, bei $\sim 30\%$.

Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte für den Anteil der maximalen Bindung sowie die jeweiligen Dissoziationskonstanten und die Güte des Fits (R^2) sind in Tabelle 5-2 wiedergegeben.

Tabelle 5-2: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalysen aus radioaktiven Filterbindungsstudien.

Variante	Austausch betrifft Loop	Anteil maximaler RNA-Bindung [%]	K_d -Wert [nM]	R^2	Auswirkung der Mutation auf die Bindung
16-3A		$30,5 \pm 3,2$	$66,6 \pm 21,7$	0,915	
16-3A_G4A	1	$1,7 \pm 2,5$	k.A.	0,244	■
16-3A_A5U	1	$27,5 \pm 2,7$	$99,6 \pm 27,3$	0,963	■
16-3A_G3U	1	$27,4 \pm 3,2$	$146,2 \pm 4,8$	0,970	■
16-3A_C8A	2	$19,9 \pm 3,2$	$169,1 \pm 63,2$	0,942	■
16-3A_G10A	2	$1,0 \pm 0,5$	k.A.	0,846	■
16-3A_U11A	2	$21,3 \pm 2,6$	$156,0 \pm 46,0$	0,968	■
16-3A_U9A	2	$9,9 \pm 2,7$	$(280 \pm 150,7)$	0,888	■
16-3A_G15U	3	$2,8 \pm 1,3$	k.A.	0,783	■
16-3A_G17U	3	$2,4 \pm 0,3$	k.A.	0,880	■
16-3A_U14A	3	$23,5 \pm 1,8$	$89,4 \pm 19,6$	0,976	■
16-3A_A16U	3	$30,5 \pm 3,0$	$82,9 \pm 23,9$	0,945	■

rot= keine Bindung; orange= teilweise Bindung; grün= Bindung

5.1.2. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) können Wechselwirkungen zwischen nicht-markierten Molekülen analysiert und kinetische Informationen der Interaktionen erhalten werden (4.5.3). Zur weiteren Charakterisierung der Bindung des Aptamers 16-3A sowie die Bindung unterschiedlicher Punktvarianten des Aptamers an Hyper-IL-6 sollte als weitere Messmethode die Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt werden.

Das Messgerät der Wahl stellte dabei das SPR-2 der Firma Sierra Sensors dar. Zunächst war es notwendig, das Zielmolekül Hyper-IL-6 auf die Oberfläche eines Sensor-Chips zu immobilisieren. Dieser Chip trug eine Goldbeschichtung mit Carboxylgruppen, welche als reaktive Gruppen der Proteinkopplung dienten. Diese funktionellen Gruppen wurden zunächst durch das Überleiten einer EDC/NHS-Lösung aktiviert. Das Zielprotein Hyper-IL-6 und das Referenzprotein IL-6 konnten anschließend auf der Goldoberfläche immobilisiert, und freie Bindungsstellen durch Ethanolamin blockiert werden (4.5.3.1). Das erhaltene Sensogramm einer Chip-Belegung ist beispielhaft in Abbildung 5-11 dargestellt.

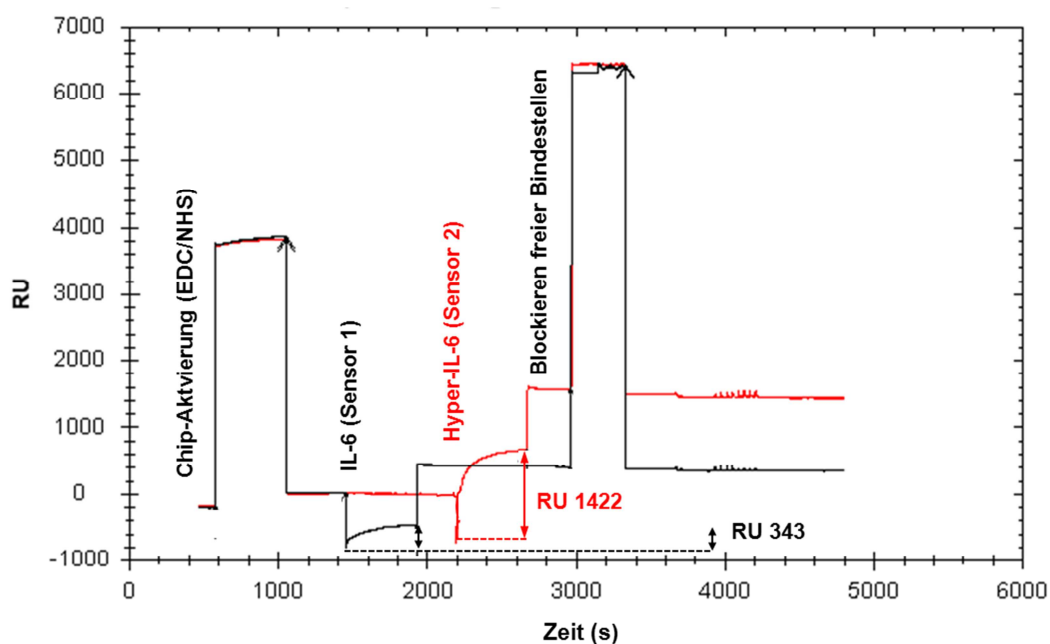


Abbildung 5-11: Belegung des Amin-Sensor-Chips für Messungen am SPR.

Die Carboxylatoberfläche des Sensor-Chips wurde durch die Injektion einer EDC/NHS-Lösung (4:1) aktiviert. Über eine Cross-Link-Reaktion konnten das Referenzprotein IL-6 auf Sensor 1 (-) und das Zielprotein Hyper-IL-6 (-) auf Sensor 2 immobilisiert werden. Durch eine Injektion von Ethanolamin (1 M, pH 8,5) wurden freie Bindestellen blockiert. Dabei ist die Signalstärke (RU) proportional zur gebundenen Masse, wobei 1 RU der Masse von 1 pg/mm^2 entspricht

Erhöht sich der Beladungsgrad der Oberfläche, äußert sich dies in einem Anstieg der RU-Werte, wobei 1 RU der Masse von 1 pg/mm^2 entspricht. Im Verlauf der Proteininjektion (je 8 min) konnte ein Anstieg der RU-Werte gemessen werden. So geht aus dem Sensogramm in Abbildung 5-11 hervor, dass auf der Oberfläche der Durchflusszelle bei Sensor 2 ca. 1422 pg/mm^2 Hyper-IL-6 immobilisiert werden konnten. Auch das als Referenz-Protein fungierende IL-6 konnte erfolgreich, mit ca. 343 pg/mm^2 , auf der Chipoberfläche fixiert werden. Mit Hinblick auf die unterschiedlichen molaren Massen der Proteine IL-6 mit ca. $\sim 21 \text{ kDa}$ und Hyper-IL-6 mit etwa $\sim 80 \text{ kDa}$ wurden somit nahezu äquimolare Mengen der Proteine auf der jeweiligen Chipoberfläche verankert.

5.1.2.1. Analyse der Bindung des Aptamers 16-3A an Hyper-IL-6 mittels SPR

Zunächst sollte die Bindung des kommerziell erworbenen und damit über chemische Festphasensynthese hergestellten Aptamers 16-3A mittels SPR untersucht werden. Hierfür wurden steigende Konzentrationen des Aptamers in Selektionspuffer (8 - 500 nM) über 120 s in das Flusssystem injiziert, das System für 180 s mit Selektionspuffer gewaschen und ein Sensogramm für die Kanäle 1 und 2 aufgenommen. Verbliebenes Aptamer wurde durch eine Injektion von HCl (100 mM) zwischen den Messungen vom Chip eluiert. Zur Analyse einer spezifischen Interaktion zwischen RNA und Hyper-IL-6 wurde jeweils das Signal des Kanals 1 (IL-6, Referenzkanal) vom Signal des Kanals 2 (Hyper-IL-6) subtrahiert (4.5.3.2). Die Differenz beider Signale (angegeben in RU) ist in Abbildung 5-12 graphisch dargestellt.

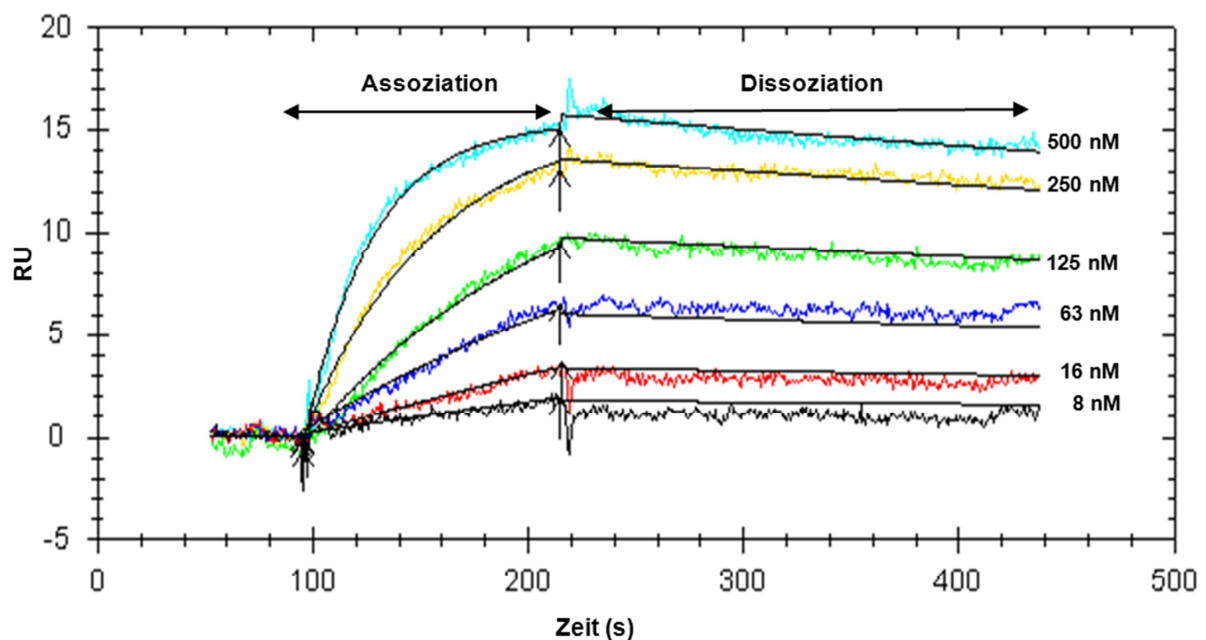


Abbildung 5-12: SPR-Sensogramm der Assoziation und Dissoziation des Aptamers 16-3A an/von Hyper-IL-6.

Das Aptamer-16-3A wurde mit konstanter Flussrate (25 $\mu\text{L}/\text{min}$) in die Durchflusszelle injiziert (120 s), anschließend wurde mit Puffer gespült (180 s). Das detektierte Signal an Sensor 1 (IL-6) wurde vom Signal an Sensor 2 (Hyper-IL-6) subtrahiert. Die Bindung des Aptamers an das immobilisierte HIL-6 führte zu einem Anstieg der Resonanz-Units (RU). Nach der Probeninjektion folgte nur eine langsame Dissoziation des Aptamers. Dargestellt ist die Bindung bzw. Dissoziation des Aptamers bei verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit der Zeit sowie der globale Fit nach einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell.

Nach erfolgter Probeninjektion (120 s) des Aptamers 16-3A kam es zu einer Interaktion zwischen dem Aptamer und dem Zielprotein HIL-6. Durch Erhöhung der Schichtdicke der Goldoberfläche stiegen die detektierten RU-Werte an Sensor 2. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Antwort auf den erhaltenen Sensorgrammen abgelesen werden. Mit steigender Konzentration erhöhten sich auch die erhaltenen RU-Werte. Nach Ablauf der

Probeninjektion wurde für 180 s Selektionspuffer über den Sensor-Chip geleitet, wodurch die Dissoziationsphase des Aptamers vom Protein Hyper-IL-6 eingeleitet wurde. Die Dissoziation des Aptamers 16-3A vom Hyper-IL-6 und damit von der Chipoberfläche erfolgte nur sehr langsam, was deutlich an der geringen Reduktion der Resonanz-Einheiten (RU) zu erkennen ist. Innerhalb von 3 min war lediglich eine Verringerung von max. 1 RU zu verzeichnen. Die Ergebnisse wurden nach einem globalen 1:1 Langmuir-Bindungsmodell gefittet, um detaillierte Informationen über die Kinetik der Bindung zu erhalten. Es konnte ein K_d -Wert von 8,5 nM, eine Dissoziationsrate k_d von $5,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Assoziationsrate k_a von $6,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

Die mittels SPR zu analysierenden Punktvarianten des Aptamers 16-3A wurden alle mittels *in vitro* T7-Transkription hergestellt. Da das Aptamer 16-3A bislang lediglich als chemisch synthetisierte Variante vermessen wurde und ein direkter Vergleich somit nicht möglich wäre, wurde die RNA des Aptamers 16-3A zunächst mittels T7-Transkription produziert und ebenfalls einer SPR-Analyse unterzogen (Abbildung 5-13).

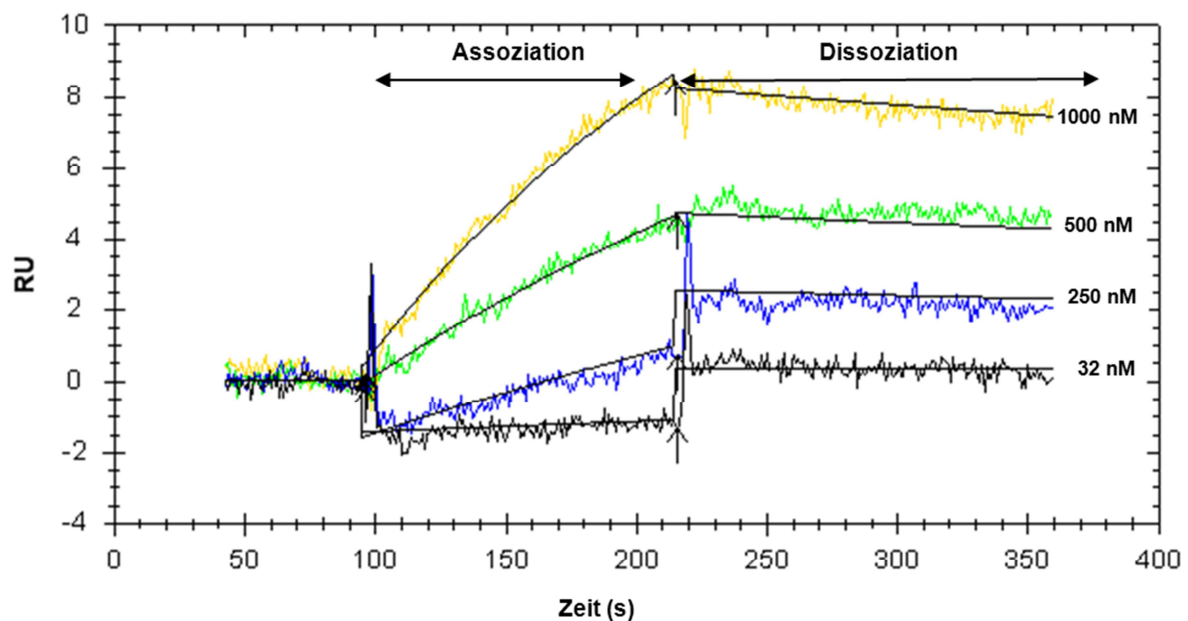


Abbildung 5-13: SPR-Analyse der Interaktion zwischen dem durch T7-Transkription gewonnenen Aptamers 16-3A und Hyper-IL-6.

Das Aptamer-16-3A wurde über *in vitro* T7-Transkription hergestellt und mittels präparativer denaturierender PAGE gereinigt. Steigende Konzentrationen (32-1000 nM) wurden jeweils für 2 min mit konstanter Flussrate (25 $\mu\text{L}/\text{min}$) in die Durchflusszelle injiziert. Als Puffersystem fungierte Selektionspuffer mit 0,01% (v/v) Tween20. Das detektierte Signal an Sensor 1 (IL-6) wurde vom Signal an Sensor 2 (Hyper-IL 6) subtrahiert. Dargestellt ist die Bindung bzw. Dissoziation des Aptamers bei verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit der Zeit sowie der globale Fit nach einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell.

Auch in der Analyse des selbst produzierten Aptamers zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bindung, gezeigt durch die Steigungen der RU-Werte in Abbildung 5-13. Die Dissoziation erfolgte wiederum nur sehr langsam, da über einen Zeitraum von mehr als 200 s nach Stopp der Probeninjektion die Werte der Response-Units nur wenig abnahmen. Durch Fitten der Daten konnte ein K_d -Wert von 135 nM, eine Dissoziationsrate von $7,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Assoziationsrate von $5,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden.

Die Ergebnisse der SPR-Analyse des kommerziell bzw. über *in vitro* T7-Transkription erhaltenen Aptamers 16-3A sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Affinität und Kinetik der Bindung des Aptamers 16-3A an Hyper-IL-6 mittels SPR-Analyse.

	K_d (nM)	Assoziation k_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Dissoziation k_d (s^{-1})	RU_{max}
kommerziell	8,5	$6,3 \times 10^4$	$5,4 \times 10^{-4}$	16,3
T7-Transkription	135	$5,2 \times 10^3$	7×10^{-4}	8,6

Es zeigte sich, dass die Assoziation des selbst hergestellten Aptamers um etwa eine Größenordnung langsamer verläuft als die kommerziell erhaltene Variante.

5.1.2.2. Analyse von Punktvarianten des Aptamers 16-3A mittels SPR

Um die Ergebnisse der radioaktiven Filterbindungsstudien in Bezug auf die Mutationsanalysen des Aptamers 16-3A zu verifizieren, wurden die Punktvarianten mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) analysiert (4.5.3.2). Die zu untersuchenden Nukleinsäuren wurden mittels *in vitro* Transkription hergestellt und gereinigt (4.2 ff). Für die Analyse der Bindung an das immobilisierte Hyper-IL-6 auf dem Sensor-Chip wurde die Probe mit einer Konzentration von 1 μM in Selektionspuffer mit 0,01% Tween20 für 2 min in das Flusssystem injiziert. Die Dissoziation wurde für einen Zeitraum von 180 s aufgenommen. Verbliebenes Aptamer wurde mit HCl (100 mM) vom Chip eluiert (4.5.3.2). Beispielhaft ist im Folgenden das Sensorgramm der Ergebnisse für die Analyse des Loops 3 dargestellt (Abbildung 5-14).

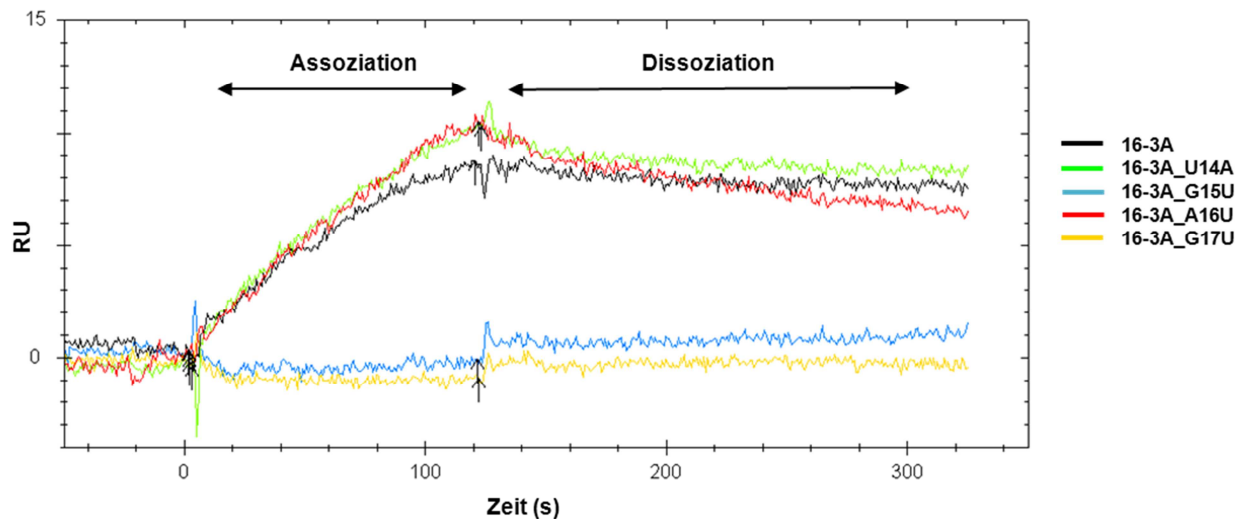


Abbildung 5-14: Bindungsanalyse der Interaktion zwischen den Punktvarianten aus Loop 3 und Hyper-IL-6 mittels SPR.

Das Aptamer 16-3A sowie diverse Punktvarianten des Loops 3 wurden mittels T7-Transkription produziert und mittels PAGE gereinigt. Je 1 μM (in Selektionspuffer, 0,01% (v/v) Tween20) der entsprechenden Probe wurden für 2 min über den Sensor-Chip geleitet. Anschließend wurde in das System Selektionspuffer (+ 0,01% (v/v) Tween20) geleitet. Das Signal von Sensor 1 (IL-6) wurde vom Signal an Sensor 2 (Hyper-IL-6) subtrahiert. Das Nettosignal an Sensor 2 ist in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

Es zeigte sich, dass ein Basenaustausch von U14A sowie A16U keinen Einfluss auf die Bindung des Aptamers zum Zielprotein Hyper-IL-6 hat. Das Ausgangsaptamer 16-3A, welches über *in vitro* T7-Transkription erhalten wurde, zeigte einen vergleichbaren Assoziations- und Dissoziationsverlauf. Hingegen führte die Mutation G15U und G17U zu einem vollständigen Verlust der Affinität. Auf die Analyse der konzentrationsabhängigen Bindung an das Zielprotein Hyper-IL-6 wurde bei den Punktvarianten verzichtet. Es wurde jeweils nur die Bindung bei einer Konzentration von 1 μM untersucht. Somit konnten keine konkreten Einblicke auf die Kinetik der Bindung gewonnen werden. Die vollständigen Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels SPR sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

Tabelle 5-4: Übersicht der Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels SPR

Punktvariante	Bindung in Filterbindungsstudie	Bindung in SPR- Analyse
G4A	nein	nein
A5U	ja	ja
G3U	ja	ja
C8A	ja	ja
G10A	nein	nein
U11A	ja	ja
U9A	(ja)	nein
G15U	nein	nein
G17U	nein	nein
U14A	ja	ja
A16U	ja	ja

Somit konnten die Ergebnisse aus den radioaktiven Filterbindungsstudien in allen untersuchten Mutanten erfolgreich mittels SPR verifiziert werden. Es zeigte sich, dass zahlreiche Nukleotide, welche in den mutmaßlichen Loopregionen des G-Quadruplexes liegen, nicht an der spezifischen Bindung an das Hyper-IL-6 beteiligt sind, da ein Basenaustausch zu keinem Verlust der Bindungseigenschaften führte.

5.2. 2'-F-Modifikationen des Aptamers

Nachdem in Mutationsstudien gezeigt werden konnte, dass das Cytosin an Position 8 des Aptamers für die Bindung keine essentielle Rolle spielt und die Variante 16-3A_8CA mit zum Aptamer 16-3A vergleichbarer Affinität an HIL-6 binden konnte, wurde eine 2'-F-CTP-modifizierte Variante des Aptamers mittels T7-Transkription produziert (4.2.3). Als Kontrolle wurde ebenfalls die nicht-bindende Punktvariante 16-3A_G17U mit modifiziertem Cytidintriphosphat transkribiert und mit γ -³²P-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Um die Bindung der modifizierten Aptamere zu untersuchen, wurden radioaktive Filterbindungsstudien durchgeführt (4.5.1).

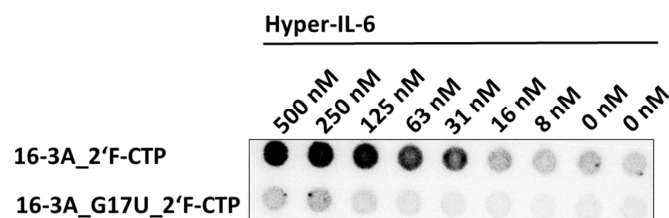


Abbildung 5-15: Filterbindungsstudie des 2'-F-modifizierten Aptamers.

Das Aptamer 16-3A sowie die Punktvariante 16-3A_G17U wurden transkribiert, wobei das Cytidin an Position 8 durch Verwendung von 2'-F-CTP ersetzt wurde. Die RNAs wurden am 5'-Ende mit dem Isotop γ -³²P-ATP markiert und mit steigenden Konzentrationen des Proteins HIL-6 inkubiert. Nach einer Filtration über eine Nitrozellulosemembran wurde die auf der Membran verbliebene RNA mittels Autoradiographie visualisiert.

In radioaktiven Filterbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass das 2'-F-CTP-modifizierte Aptamer 16-3A seine Affinität zum Zielprotein Hyper-IL-6 trotz der Modifikation beibehält. Ein Beispiel einer Filterbindungsstudie ist in Abbildung 5-15 darstellt. Dabei wird durch die zunehmende Schwärzung je Dot deutlich, dass das 2'-F-CTP-modifizierte Aptamer 16-3A im Gegensatz zur ebenfalls modifizierten Punktvariante 16-3A_G17U das HIL-6 konzentrationsabhängig bindet. Nach Auswertung und Quantifizierung mit der Software QuantityOne® wurde der Anteil der prozentualen RNA-Bindung durch den zweimaligen Auftrag einer 200%-Kontrolle berechnet. Um die Bindung näher zu charakterisieren, wurden die Ergebnisse mehrerer Bindungsstudien mit der Software GraphPad Prism® analysiert (Abbildung 5-16).

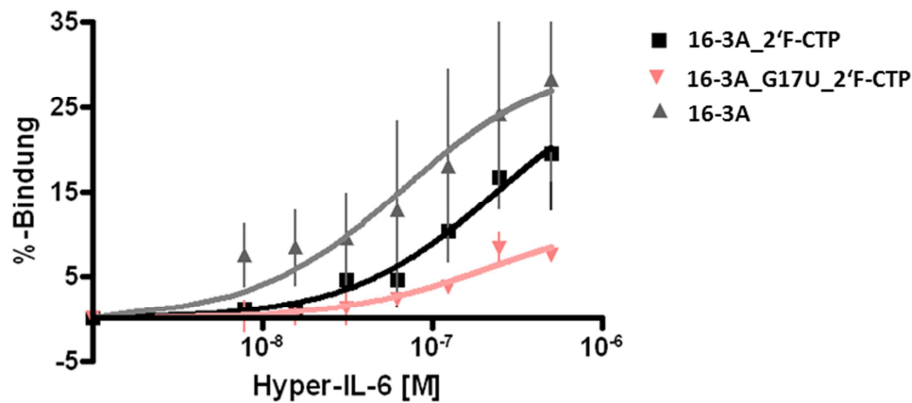


Abbildung 5-16: Graphische Auswertung der Filterbindungsstudien des Aptamers 16-3A_2'F-CTP.

In Filterbindungsstudien wurde die Affinität des modifizierten Aptamers zum Protein HIL-6 untersucht. Die Schwärzung der Membran wurde quantifiziert und der Anteil der prozentualen Bindung berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der prozentualen Bindung in Abhängigkeit der HIL-6 Konzentration aus drei Experimenten (16-3A 12 Experimente). Es wurden die Ergebnisse nach einem *one-to-one* Bindungsmodell gefittet.

Dabei konnte der Anteil der maximalen Bindung sowie ein K_d -Wert für das 2'F-CTP-modifizierte Aptamer ermittelt werden. Das unmodifizierte Aptamer wurde stets als Positivkontrolle in die Filterbindungsstudien mit einbezogen. Die Ergebnisse der Studien sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst (Tabelle 5-5).

Tabelle 5-5: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien für das sIL-6R-spezifische Aptamer 16-3A, die 2'F-modifizierte Variante 16-3A_2'F-CTP und der Punktvariante 16-3A_G17U_2'F-CTP.

Name	Anteil maximaler Bindung [%]	K_d [nM]	R^2
16-3A	$30,5 \pm 3,2$	$66,6 \pm 21,7$	0,915
16-3A_2'F-CTP	$29,7 \pm 3,5$	$235 \pm 59,8$	0,980
16-3A_G17U_2'F-CTP	$10,1 \pm 2,8$	k. A.	0,97

Das modifizierte Aptamer 16-3A_2'F-CTP zeigte einen geringen Affinitätsverlust im Vergleich zum unmodifizierten Aptamer 16-3A. Der Anteil der maximalen Bindung veränderte sich nicht. Die Punktvariante 16-3A_G17U_2'F-CTP zeigte keine starke Interaktion mit Hyper-IL-6. Der Anteil der maximalen Bindung war mit etwa 10% sehr niedrig, jedoch nachweisbar, was vermutlich auf unspezifische Wechselwirkungen zur Filtermembran von 2'F-modifizierten Nukleinsäuren zurückzuführen ist.

5.3. Analyse der Stabilität des Aptamers in Zellkulturmedium

Für eine mögliche Verwendung des Aptamers für *in vivo* Applikationen sollte das Aptamer 16-3A in Medium bzw. Serum stabil sein. In vorherigen Studien wurde diese Eigenschaft bereits für das 106 nt lange Ausgangsaptamer 16-3 untersucht [6]. Um nun die auf 19 nt reduzierte Form, das Aptamer 16-3A, dahingehend zu untersuchen, wurde das Aptamer nach Radioaktivmarkierung (4.2.6) in DMEM-Medium mit bzw. ohne den Zusatz von Serum (FKS, 10% (v/v)) für unterschiedliche Zeitspannen bei 37°C inkubiert und mittels denaturierender PAGE analysiert (Abbildung 5-17).

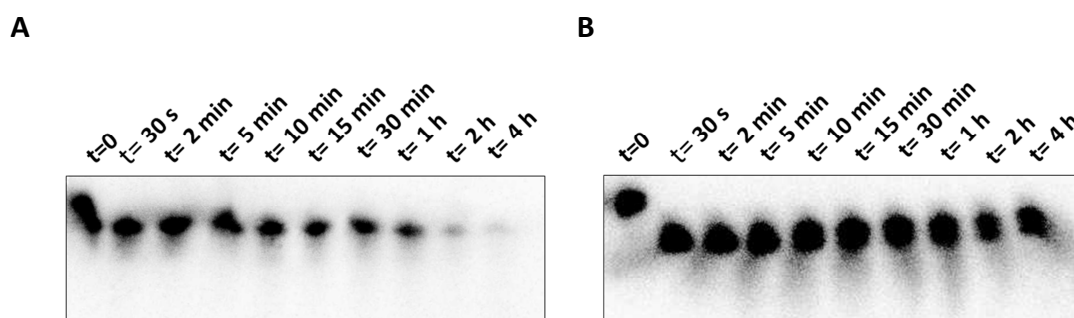


Abbildung 5-17: Stabilitätstest des Aptamers 16-3A in Zellkulturmedium.

Das Aptamer 16-3A wurde radioaktiv markiert und in Zellkulturmedium (DMEM) ohne (A) bzw. mit (B) fötalem Kälberserum (10% (v/v)) über verschiedene Zeitspannen (0 s bis 4 h) inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf einem 15% denaturierenden PAA-Gel getrennt, das Gel getrocknet und mittels Autoradiographie visualisiert.

Es wurde beobachtet, dass auch die verkürzte Variante des Aptamers 16-3A in Zellkulturmedium mit FKS umgehend abgebaut wird. Jedoch beschränkte sich die Degradation auf wenige Nukleotide, sodass ein verkürztes Fragment detektiert wurde (Abbildung 5-17 B). In DMEM-Medium ohne Serum blieb das Aptamer für >1h stabil (Abbildung 5-17 A).

Für zellbiologische Experimente war es daher zwingend notwendig, die Zellen gründlich zu waschen (2x mit Selektionspuffer), um verbliebenes FKS aus der Probe zu entfernen. Eine Inkubation von Zellen und dem Aptamer in Medium ohne Serum konnte dagegen für 1-2 h ohne Bedenken durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem in Filterbindungsstudien gezeigt wurde, dass der Einbau einer 2'-F-CTP-Modifizierung nicht zum Verlust, lediglich zu einer Abschwächung der Bindungseigenschaft zum Zielprotein Hyper-IL-6 führt, sollte das modifizierte Aptamer 16-3A_2'-F-CTP ebenfalls auf seine Stabilität im Zellkulturmedium überprüft werden. Das erhaltene Autoradiogramm ist in Abbildung 5-18 dargestellt.

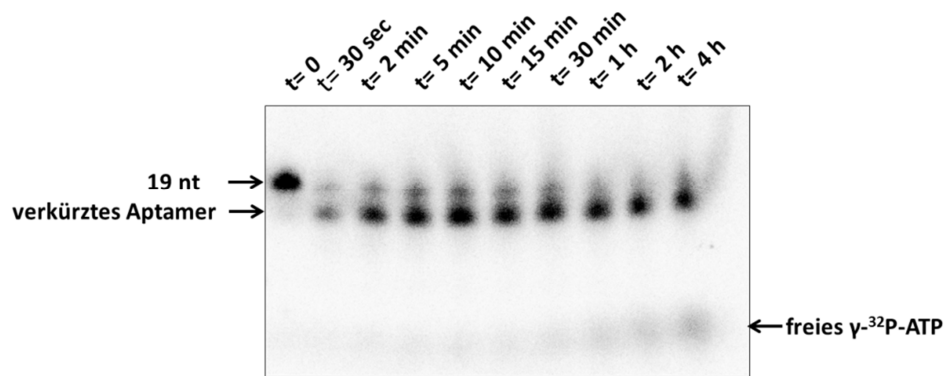


Abbildung 5-18: Stabilitätstest des 2'-F-CTP-modifizierten Aptamers 16-3A in serumhaltigen Medium.

Das modifizierte Aptamer wurde über *in vitro* T7-Transkription produziert und am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die Inkubation bei 37°C erfolgte in DMEM-Medium mit FKS (10%, (v/v)). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese mittels denaturierender PAGE (15%-iges Gel) und Autoradiographie visualisiert.

Die Modifikation des Cytidins konnte die Stabilität des Aptamers in Gegenwart von serumhaltigem Medium nur geringfügig steigern. Schon nach 2 min Inkubationszeit konnte nur noch eine schwache Bande auf Höhe des Aptamers (19 nt) detektiert werden. Als Hauptprodukt lag die verkürzte Form des Aptamers vor. Diese wies, wie auch die nicht modifizierte Form, eine über den Messzeitraum reichende gleichbleibende Stabilität auf. Freies γ - ^{32}P -ATP wurde ab ca. 10 min Inkubationszeit detektiert, dessen Anteil nahm kontinuierlich zu.

Die Annahme, dass das Aptamer durch eine Vorinkubation mit dem Zielprotein Hyper-IL-6 eine höhere Stabilität aufweist, sollte ebenfalls mittels Stabilitätsstudien in Zellkulturmedium überprüft werden.

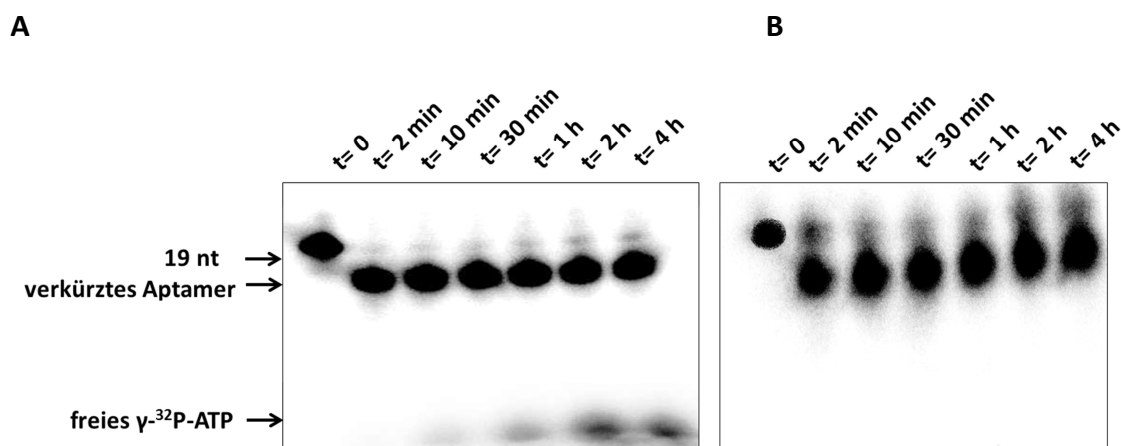


Abbildung 5-19: Stabilitätstest des mit Hyper-IL-6 inkubierten Aptamers in Zellkulturmedium.

Das Aptamer 16-3A (**A**) bzw. die 2'-F-CTP modifizierte Form (**B**) wurden mit γ - ^{32}P -ATP am 5'-Ende markiert und mit einem $>1000\times$ molaren Überschuss von Hyper-IL-6 für 10 min bei RT in Selektionspuffer inkubiert. Die Probe wurde in DMEM-Medium/FKS (10% v/v) transferiert und bei 37°C inkubiert. Die Proben nach entsprechender Inkubationszeit wurden auf einem 15%-denaturierenden PAA-Gel getrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

Die Annahme, dass eine Vorinkubation mit hIL-6 einer Degradation des Aptamers vorbeugt, konnte nicht bestätigt werden. In allen Spuren (Abbildung 5-19 A) konnte lediglich die verkürzte Form des Aptamers detektiert werden. Diese blieb über den gesamten Zeitraum stabil, da keine Verringerung der Schwärzung gemessen wurde. Auch das am C8 mit 2'F-CTP modifizierte Aptamer wurde trotz Vorinkubation mit Hyper-IL-6 umgehend abgebaut.

5.4. Nachweis des IL-6-Rezeptors und gp130 auf BAF/3-Zellen

Als Studienobjekt für die Bindung des Aptamers 16-3A an den nativen humanen IL-6R diente die murine prä-B-Zelllinie BAF/3. Diese in Suspension wachsenden Zellen wurden zum einen mit der cDNA für gp130 (BAF/3_gp130) bzw. mit der cDNA für gp130 und den hIL-6R (BAF/3_gp130_hIL-6R) stabil transfiziert und von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung wurde die Zelllinie BAF/3_gp130, welche nicht den nativen IL-6R auf der Zelloberfläche präsentiert, für die Versuche eingesetzt. Die Anwesenheit beider Transmembranproteine sollte mittels Durchflusszytometrie (4.4.3.1) bzw. Fluoreszenzmikroskopie (4.4.4.2) nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit murinen Antikörpern gegen den hIL-6R bzw. gp130 und folgend einem FITC-markierten Sekundär-antikörper (aus Ziege) inkubiert. Als Isotypkontrolle diente ein anti-tetra-His-Ak (3.7).

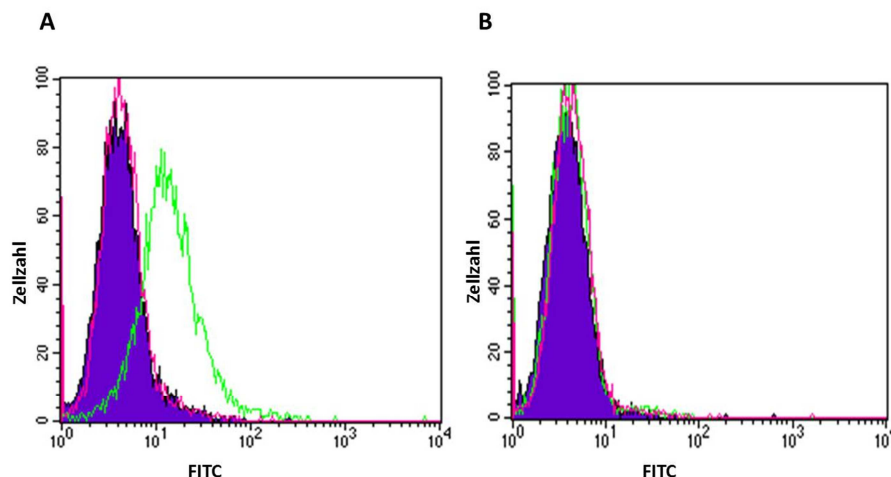


Abbildung 5-20: Nachweis des IL-6R auf BAF/3 Zellen mittels Durchflusszytometrie.

BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen (A) und BAF/3_gp130-Zellen (B) wurden durchflusszytometrisch auf die Anwesenheit des humanen IL-6R untersucht. Nach Detektion der Eigenfluoreszenz von jeweils 10.000 unmarkierten Zellen (blaues Integral, ■) wurden diese mit einem murinen primären anti-hIL-6R-AK gefolgt vom FITC-markierten sekundären Ziege-anti-Maus-AK inkubiert und durchflusszytometrisch vermessen (■). Die hIL-6R-tragenden Zellen zeigten eine Verschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Auf den BAF/3_gp130-Zellen konnte der hIL-6R nicht nachgewiesen werden. Eine Vorinkubation mit dem Primärantikörper anti-Tetra-His (Isotypkontrolle) zeigte bei beiden Zelltypen keine Verschiebung (■). Pro Messung wurden 10.000 Zellen analysiert. Zur Auswertung wurde die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (Laser 488 nm, Bandpass_filter: 525 nm) aufgetragen.

Erwartungsgemäß konnte die Präsentation des hIL-6R auf BAF/3_gp130_hIL-6R mit Hilfe eines hIL-6R-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Abbildung 5-20). Dies äußerte sich in einer Verschiebung der Anzahl an Zellen zu höheren Fluoreszenzintensitäten (Fluoreszenz-Shift). Eine unspezifische Bindung des FITC-markierten Sekundärantikörpers konnte durch Analyse einer Isotypkontrolle weder bei BAF/3_gp130 noch bei BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen beobachtet werden.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sollten zusätzlich fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dienen (Abbildung 5-21). Hierfür wurden ebenfalls die bereits in der Durchflusszytometrie angewandten spezifischen Antikörper eingesetzt.

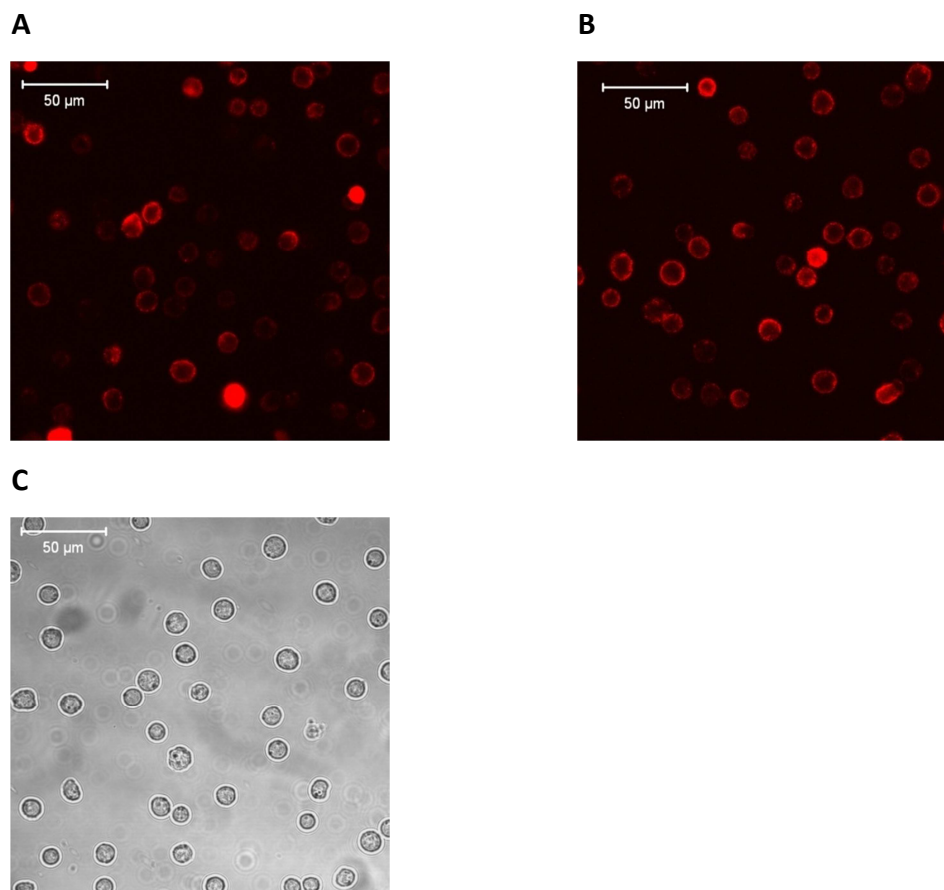


Abbildung 5-21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Membranproteine gp130 und hIL-6R auf BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen.

(A) Mit Hilfe des Primärantikörpers anti-gp_130 und des daran bindenden Sekundärantikörpers anti-Maus_APC konnte im Fluoreszenzkanal (633 nm) das Protein gp130 auf der Oberfläche von BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen visualisiert werden. (B) Dargestellt ist die Detektion des hIL-6-Rezeptors auf BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen mittels des Primärantikörpers anti-hIL-6R in Kombination mit dem Sekundärantikörper anti-Maus_APC im Fluoreszenzkanal (633 nm). (C) Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers anti-Maus_APC auszuschließen, wurde eine Isotypkontrolle mit dem Primärantikörper anti_Tetra-His in Kombination mit anti-Maus-APC durchgeführt. Dargestellt ist die Überlagerung des Fluoreszenz (633 nm) – und Durchlichtkanals.

Die Anwesenheit des humanen IL-6-Rezeptors (Abbildung 5-21 A) und des gp130 (Abbildung 5-21 B) konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper (anti-hIL-6R-AK bzw. anti-gp130-AK plus APC-Ziege-anti-Maus-AK) fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Als Isotypkontrolle (Abbildung 5-21 C) wurde ein muriner anti-Tetra-His-Primärantikörper verwendet, welcher nach Inkubation der Zellen mit dem sekundären APC-Ziege-anti-Maus-AK keine Färbung der Zellen hervorrief. Somit konnte eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden.

Die Anwesenheit von gp130 sollte auf der Kontroll-Zelllinie BAF/3 ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 5-22).

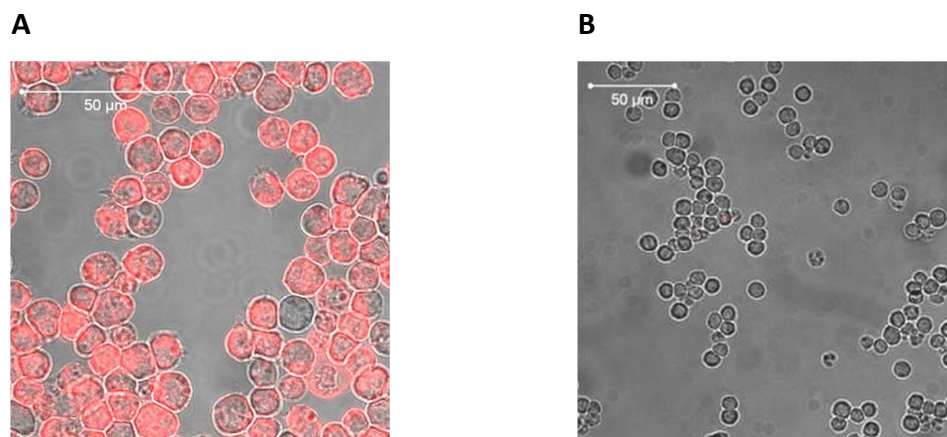


Abbildung 5-22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis des Proteins gp130 auf BAF/3_gp130-Zellen.

(A) Die Präsentation von gp130 wurde mit Hilfe des Primärantikörpers anti-gp130 gefolgt vom Sekundärantikörper anti-Maus_APC nachgewiesen. **(B)** Eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper wurde durch eine Isotypkontrolle ausgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen mit dem primären anti-Tetra-His gefolgt vom sekundären mit APC-konjugierten anti-Maus Antikörper inkubiert. Dargestellt ist die Überlagerung des Fluoreszenz (633 nm) –und Durchlichtkanals.

Die Präsentation des Proteins gp130 konnte durch die Fluoreszenzaufnahmen bestätigt werden (Abbildung 5-22 A). Die Anwesenheit des Proteins äußerte sich in einer roten Färbung der Zellen. Eine Isotypkontrolle zeigte auch hier, dass keine Bindung des Sekundärantikörpers an die Zelllinie BAF/3_gp130 vorlag (Abbildung 5-22 B).

5.5. Bindung des Aptamers 16-3A an den nativen IL-6-Rezeptor

Mit Hilfe Fluoreszenz-basierter Methoden sollte die Frage geklärt werden, ob das IL-6R-spezifische Aptamer 16-3A den nativen IL-6-Rezeptor auf BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen detektieren kann. Hierfür wurde das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto647N markierte Aptamer sowie die Punktvariante 16-3A_G17U kommerziell erworben (3.9.).

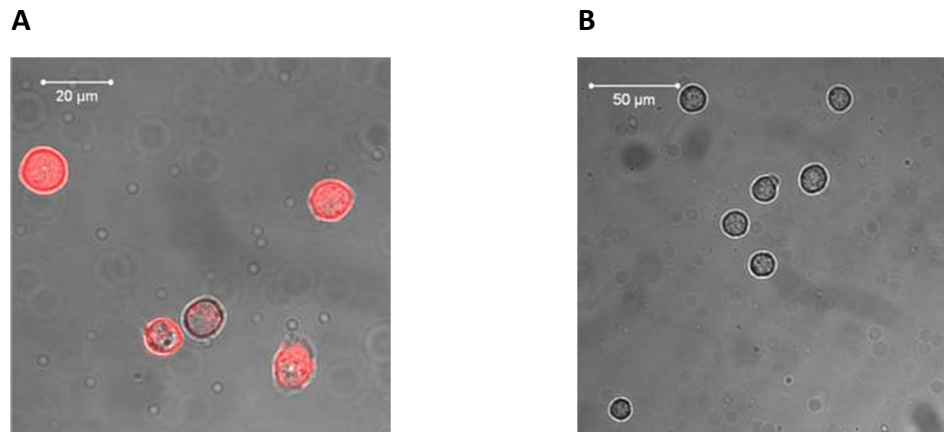


Abbildung 5-23: Nachweis der Aptamer-Bindung an IL-6R tragende BAF/3-Zellen am Fluoreszenzmikroskop.

BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen wurden mit Atto647N-markiertem Aptamer 16-3A **(A)** bzw. der Punktvariante 16-3A_G17U **(B)** auf Eis inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das Ergebnis der Überlagerung des Fluoreszenz- (633 nm) und Durchlichtkanals.

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen konnte die spezifische Bindung des Aptamers 16-3A an IL-6R-tragende BAF/3-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5-23 A). Dies äußerte sich in einer starken Rotfärbung der Zellen. Die Punktvariante 16-3A_G17U zeigte keine Bindung an die Zellen (Abbildung 5-23 B).

Um die spezifische Bindung des Aptamers 16-3A an IL-6R-tragende Zellen zu verifizieren, wurden diese auch am Durchflusszytometer analysiert (4.4.3.3). Als Nachweis für die Spezifität der Bindung an den IL-6R wurde zur Kontrolle ebenfalls eine Untersuchung von BAF/3_gp130-Zellen herangezogen (Abbildung 5-24).

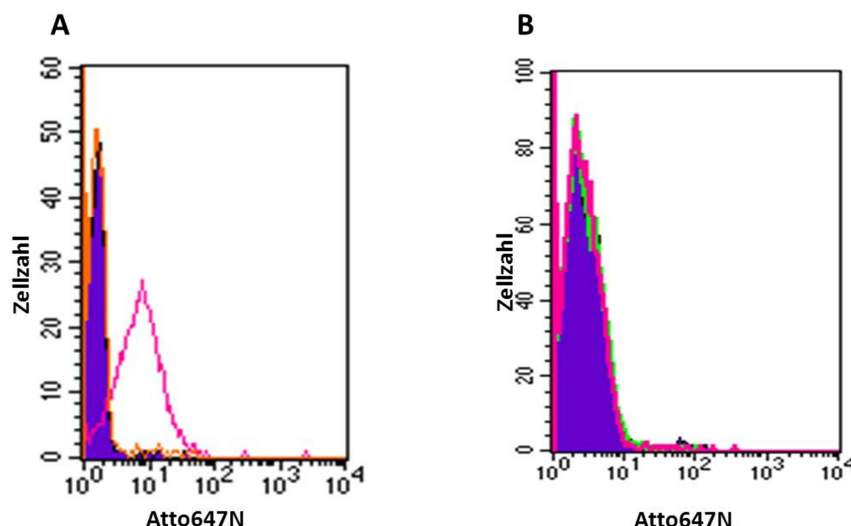


Abbildung 5-24: Analyse der Aptamer-Bindung an den nativen IL-6R mittels Durchflusszytometrie.

(A) Mittels Durchflusszytometrie wurden BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen auf ihre Autofluoreszenz im roten Kanal (Laser 633 nm) untersucht (blaues Integral, ■). Die Zellen wurden mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N (■) und der Punktvariante 16-3A_G17U_Atto647N (■) inkubiert. Die Interaktion des Aptamers 16-3A mit dem membranständigen IL-6R führte zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität. **(B)** BAF/3_gp130 Zellen wurden auf ihre Autofluoreszenz (blaues Integral, ■) analysiert. Nach Inkubation mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N (■) und der Punktvariante 16-3A_G17U_Atto647N (■) konnte kein Fluoreszenz-Shift verzeichnet werden.

Das nur 19 nt lange Aptamer 16-3A war zur spezifischen Erkennung des nativen IL-6R fähig. Dies zeigte sich durch eine deutliche Fluoreszenzmarkierung IL-6R-tragender Zellen (Abbildung 5-24 A). Die Punktvariante 16-3A_G17U zeigte hingegen keine Bindung an IL-6R-präsentierende Zellen. Beide Nukleinsäurespezies waren nicht zur Bindung an die Kontrollzellen BAF/3-gp130 befähigt. Zu erkennen ist dies an der ausbleibenden Verschiebung zu höherer Fluoreszenzintensität (Abbildung 5-24 B).

Die Frage, ob eine konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers 16-3A an den Zielzellen vorliegt, sollte mittels Durchflusszytometrie beantwortet werden. Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe des Fluoreszenz-markierten Aptamers 16-3A sowie der Punktvariante 16-3A_G17U vorbereitet und, wie bereits beschrieben (4.4.3.3), die Zelltyp-spezifische Bindung durchflusszytometrisch vermessen. Als weitere Kontrollen wurden zwei ebenfalls Fluoreszenz-markierte Nukleinsäuren (Dicer-Substrat_as_488/647N & gapdh_sense_647N) untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 5-25 dargestellt.

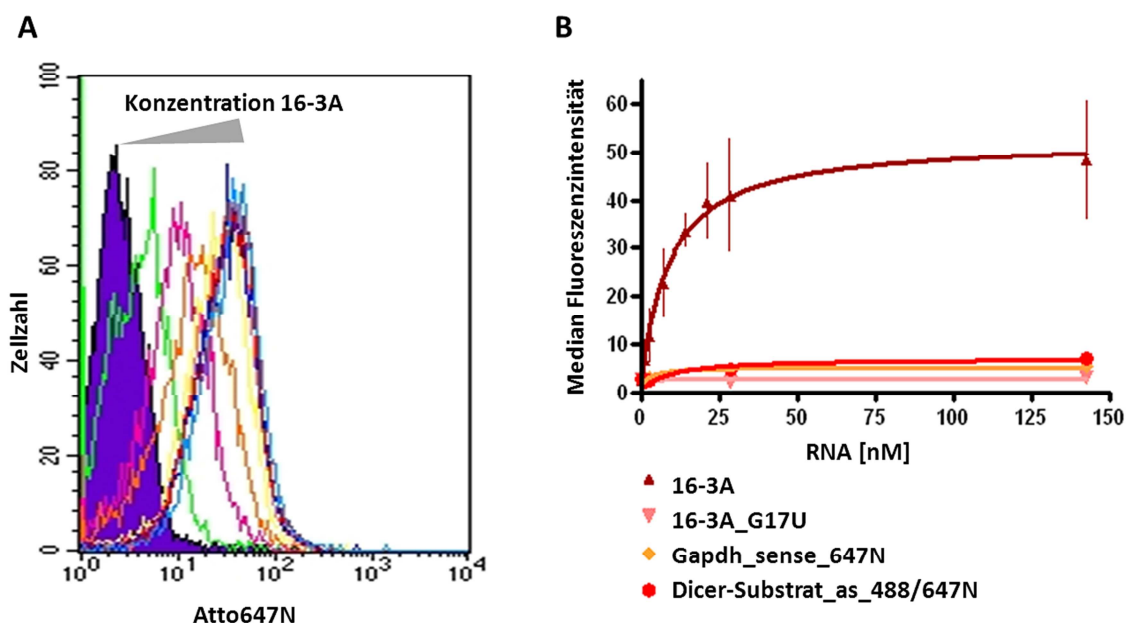


Abbildung 5-25: Konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers 16-3A an den nativen IL-6R auf BAF/3-Zellen.

(A) Eine Konzentrationsreihe (0,3 - 142 nM) des Aptamers 16-3A_Atto647N wurde mittels Durchflusszytometrie an BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen untersucht. Mit steigender Konzentration des Aptamers vergrößerte sich die Verschiebung hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten. (B) Das Median der Fluoreszenzintensität wurde gegen die Konzentration der vermessenen Fluoreszenz-markierten RNA aufgetragen und nach einem *one-to-one*-Bindungsmodell gefittet.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers 16-3A an hIL-6R-tragende BAF/3-Zellen (Abbildung 5-25 A). Für die zur Kontrolle herangezogenen Nukleinsäuren konnte auch bei RNA-Konzentrationen von >100 nM keine Interaktion mit den BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen nachgewiesen werden. Verdeutlicht wird dies durch die

Auftragung der mittleren Fluoreszenzintensitäten gegen die RNA-Konzentration unter Verwendung der Software GraphPad Prism®. Aus der resultierenden hyperbolischen Bindungskurve konnte für das Atto647N-markierte Aptamer 16-3A ein „Pseudo- K_d “ von $8,5 (\pm 1)$ nM ermittelt werden. Die Daten wurden dabei nach einem *one-site-binding*-Modell gefittet.

5.6. Internalisierung des IL-6R-spezifischen Aptamers 16-3A

5.6.1. Durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis einer Internalisierung des Aptamers 16-3A in BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen

Um zu untersuchen, ob das Aptamer16-3A nicht nur in der Lage ist, an BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen zu binden, sondern auch aufgenommen werden kann, wurden diese mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N bei 37°C oder auf Eis inkubiert und mittels Durchflusszytometer analysiert (4.4.3.3). Internalisierungsprozesse von Proteinen der Zelloberfläche ins Zellinnere sind deutlich bei 37 °C nachweisbar. Auf Eis laufen diese Prozesse stark verlangsamt ab [140]. Ein direkter Vergleich der durchflusszytometrischen Analysen zeigte zunächst keinen Unterschied der absoluten Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Der Grund ist, dass zwischen der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche und der Fluoreszenz im Zellinneren nicht differenziert wird, so lange die Zellen ohne weitere Behandlung nach Inkubation bei 37°C bzw. auf Eis direkt vermessen wurden (Abbildung 5-26 C).

Um zwischen Fluoreszenz-markierten Nukleinsäuren auf der Zelloberfläche und im Zellinneren unterscheiden zu können, wurden die Zielzellen nach Inkubation mit dem Aptamer 16-3A einerseits einer 10-minütigen Trypsinbehandlung unterzogen, wobei Proteine der Zelloberfläche degradiert werden. Andererseits wurden die Zellen einer PMA-Behandlung (Phorbol-12-myristat-13-acetat) unterzogen. PMA führt zur spezifischen Stimulation der Proteasen ADAM17/10 und damit zum zielgerichteten *Shedding* des IL-6R von der Zelloberfläche (4.4.3.2). Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 5-26 gezeigt.

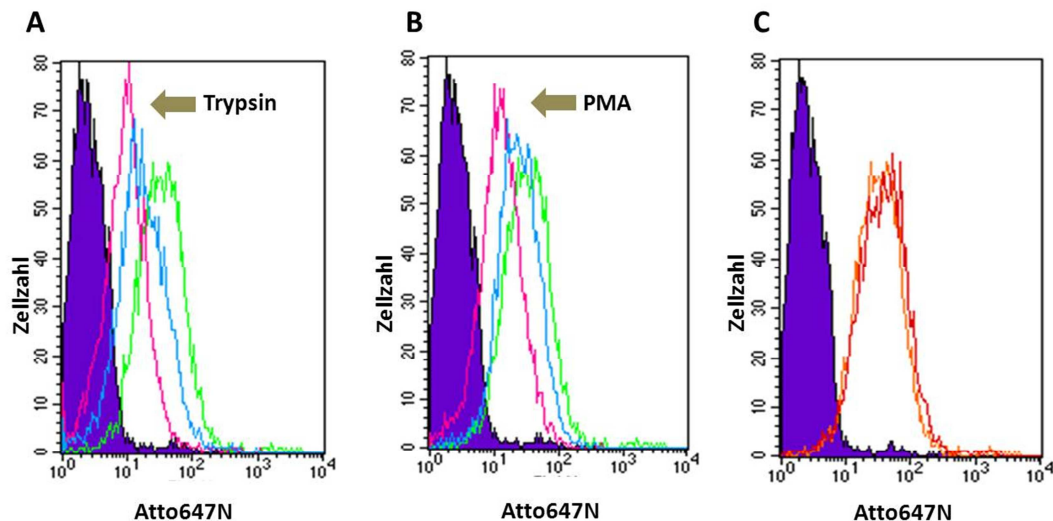


Abbildung 5-26: Analyse der Aptamer-Internalisierung mittels Durchflusszytometrie.

(A/B) Im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz (blaues Integral, $\blacksquare$) zeigte sich nach Inkubation mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N ($\blacksquare$) eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz. Wurde das Aptamer auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend mit Trypsin (A)/PMA (B) behandelt ($\blacksquare$) fiel der *Shift* deutlich geringer aus. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ($\blacksquare$) und anschließender Trypsin-(A)/PMA(B)-Behandlung ging das Fluoreszenzsignal ebenfalls, aber nicht so deutlich zurück. (C) BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen wurden für 10 min auf Eis ($\blacksquare$) bzw. bei 37°C ($\blacksquare$) mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N inkubiert.

Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 5-26 wird deutlich, dass das Aptamer nach spezifischer Bindung an den nativen IL-6R von BAF/3-Zellen aufgenommen wird, sofern die Inkubationstemperatur den physiologischen Ansprüchen genügt. Durch die Protease Trypsin ist es möglich, noch an den membranständigen Rezeptor gebundenes Aptamer unspezifisch zu entfernen. Wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, war ein Teil der Aptamere bereits mit dem Rezeptor internalisiert und durch Trypsin nicht mehr erreichbar. Somit fiel der Fluoreszenz-*Shift* geringer aus als bei Zellen, die zuvor auf Eis inkubiert wurden (Abbildung 5-26 A). Vergleichbar dazu sind die Ergebnisse nach einer Inkubation mit PMA (Abbildung 5-26 B). Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Fluoreszenz-*Shifts*, je nachdem ob die Zellen auf Eis oder bei 37°C inkubiert wurden.

Diese Ergebnisse belegen die Vermutung, dass die Internalisierung der Aptamere durch eine Inkubation bei 37°C initiiert wurde. Ein Großteil des Aptamers verbleibt jedoch an der Zellmembran.

Um sicherzustellen, dass die Internalisierung nach spezifischer Bindung des Aptamers 16-3A an den hIL-6R erfolgt, wurden die Internalisierungsversuche mit der Punktvariante 16-3A_G17U (Atto647N-markiert) wiederholt (Abbildung 5-27).

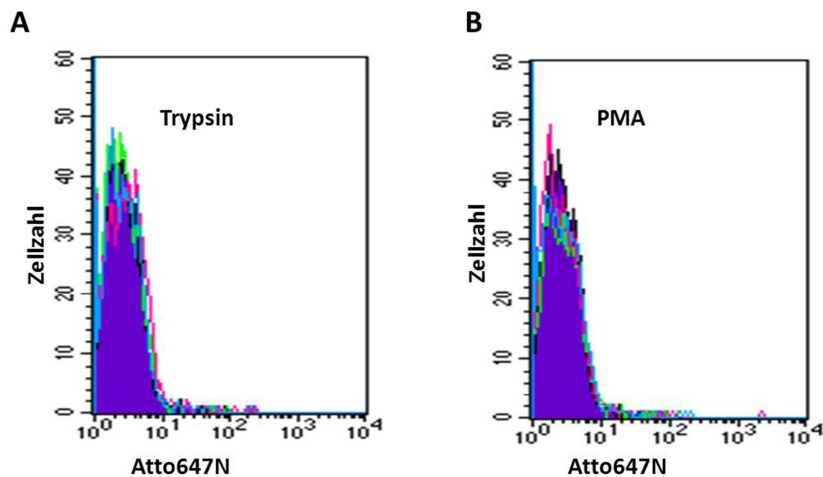


Abbildung 5-27: Nachweis der Spezifität der Internalisierung mittels Durchflusszytometer.

(A) BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen wurden mit der Punktvariante 16-A_G17U_Atto647N für 10 min bei 37°C (■) inkubiert. Optional schloss sich eine Trypsin-Behandlung an die 10-minütige Inkubation bei 37°C (■) bzw. auf Eis (■) an. Das blaue Integral entsprach der Autofluoreszenz (■). **(B)** Nach 10-minütiger Inkubation von BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen mit der Punktvariante 16-A_G17U_Atto647N bei 37°C (■) ergab sich keine Verschiebung der Fluoreszenz im Vergleich zur Autofluoreszenz (■). Wurde nach der Inkubation bei 37°C (■) bzw. auf Eis (■) der native IL-6R durch Zugabe von PMA *gesheded*, wurde ebenfalls kein Fluoreszenz-Shift detektiert.

BAF/3-Zellen, welche den nativen IL-6R exprimieren, wurden mit der Punktvariante 16-3A_G17U auf Eis oder bei 37°C inkubiert. Optional schloss sich eine Behandlung mit Trypsin oder eine Inkubation der Zellen mit PMA an, um den Rezeptor gerichtet von der Zelloberfläche zu spalten. Unter keinen der gewählten Bedingungen wurde eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals hin zu höheren Intensitäten beobachtet. Somit wurde davon ausgegangen, dass die Internalisierung spezifisch über den hIL-6R verläuft und eine ungerichtete Aufnahme von Nukleinsäuren zu vernachlässigen ist.

5.6.2. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Internalisierung

Um einen weiteren Hinweis auf die Internalisierung zu erhalten, wurden hIL-6R-tragende Zellen mit dem Atto647N-markierten Aptamer 16-3A inkubiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert (4.4.4.1). Dabei wurde die Lochblende auf einen Durchmesser von 200 µm eingestellt, was zu einer Schichtdicke der aufgenommenen Probe von 2,4 µm führte (Durchmesser Zelle ~20 µm). Das Ergebnis ist in Abbildung 5-28 dargestellt.

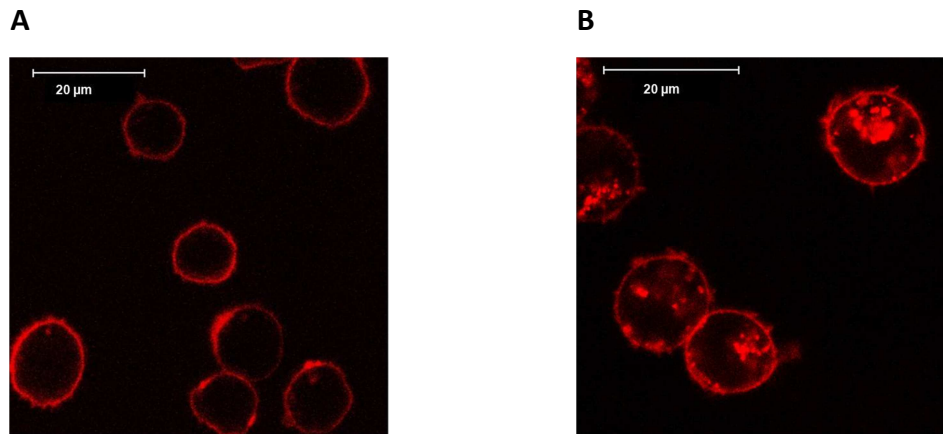


Abbildung 5-28: Nachweis der Internalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

(A) BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen wurden für 30 min mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N auf Eis inkubiert und analysiert. Der hIL-6R wurde durch das Aptamer angefärbt. **(B)** Durch eine Inkubation bei physiologischen Bedingungen (37°C) wurde das Aptamer 16-3A_Atto647N von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen aufgenommen. Schichtdicke je 2,4 µm (Pinhole 200 µm). Dargestellt sind die Aufnahmen aus dem Fluoreszenzkanal (633 nm).

Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase des Aptamers 16-3A mit BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen auf Eis zeigte sich eine deutliche Färbung der Zellmembran (Abbildung 5-28 A). Betrug die Inkubationstemperatur 37°C, beschränkte sich die Färbung der Zellen nicht nur auf den IL-6-Rezeptor der Zellmembran, sondern konnte das Aptamer auch im Zellinneren detektiert werden (Abbildung 5-28 B). Eine anschließende Trypsin-Behandlung für 10 min entfernte noch an den membranständigen IL-6R gebundenes Aptamer teilweise von der Zellmembran. Der Anteil fluoreszierender Moleküle im Zellinneren änderte sich nicht merklich (Abbildung 5-29 A). Um eine unspezifische Aufnahme Fluoreszenz-markierter Nukleinsäuren auszuschließen, wurde eine Inkubation mit der Punktvariante 16-3A_Atto647N als Vergleich herangezogen (Abbildung 5-29 B).

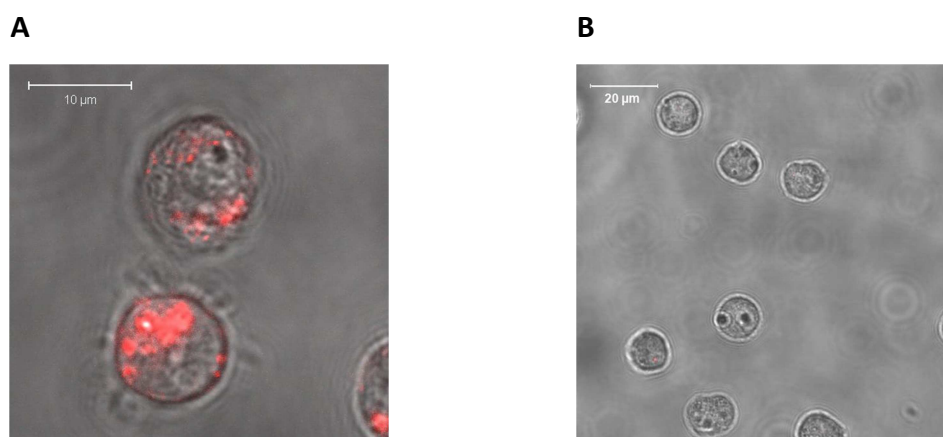


Abbildung 5-29: Trypsinierung von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen nach Internalisierung des Aptamers.

(A) Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Aptamer 16-3A_Atto647N von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen aufgenommen. Es folgte eine Inkubation mit Trypsin bei 37°C für 10 min um membrangebundenes Aptamer zu entfernen. Dargestellt ist die Überlagerung des Durchlicht- und Fluoreszenzkanals. **(B)** Die Punktvariante 16-3A_G17U_Atto647N wurde mit IL-6R tragenden Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt ist die Überlagerung des Fluoreszenz- und Durchlichtkanals. Schichtdicke je 2,4 µm (Pinhole 200 µm).

Zur Überprüfung der Internalisierung des Aptamers wurden weiterhin konfokale Aufnahmen angefertigt, bei denen die Zellen schichtweise durch die Aufnahme eines *z-stacks* gescannt wurden (Abbildung 5-30).

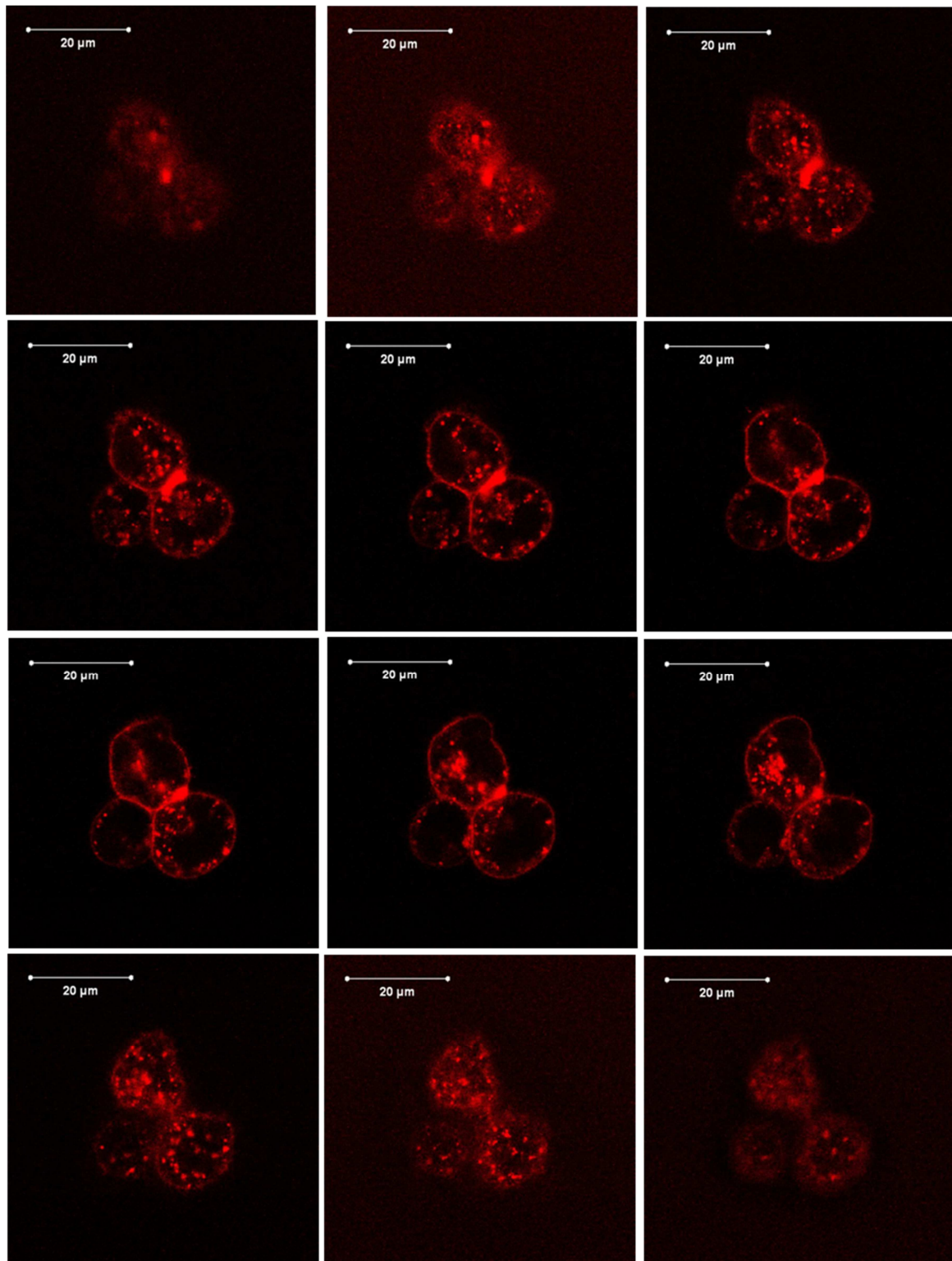


Abbildung 5-30: Konfokale Analyse der Aptamer-Internalisierung mittels LSM.

Das Aptamer 16-3A_Atto647N wurde zu BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen gegeben und diese bei 37°C für 30 min in Selektionspuffer inkubiert. Nach Internalisierung des Aptamers wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert und mittels LSM analysiert. Dargestellt sind die konfokalen Aufnahmen eines *z-stacks* im Fluoreszenzkanal (633 nm). Die *stack*-Größe betrug 15,6 µm (je Schicht 1,3 µm, *Pinhole* 200 µm).

Die konfokale Mikroskopie konnte die Internalisierung des Aptamers bestätigen.

5.6.3. Abhängigkeit der Internalisierung von IL-6

Es stellte sich die Frage, ob die Rezeptor-vermittelte Internalisierung des Aptamers 16-3A von einer Interleukin-6-Stimulation abhängig ist. Um dies zu klären, wurden die Internalisierungsversuche (5.6.1) in An- bzw. Abwesenheit des Zytokins wiederholt. Um noch an der Zelloberfläche bzw. am IL-6R gebundenes IL-6 zu entfernen, wurden die BAF/3_gp130_IL6R-Zellen zunächst 5x in 1x PBS gewaschen.

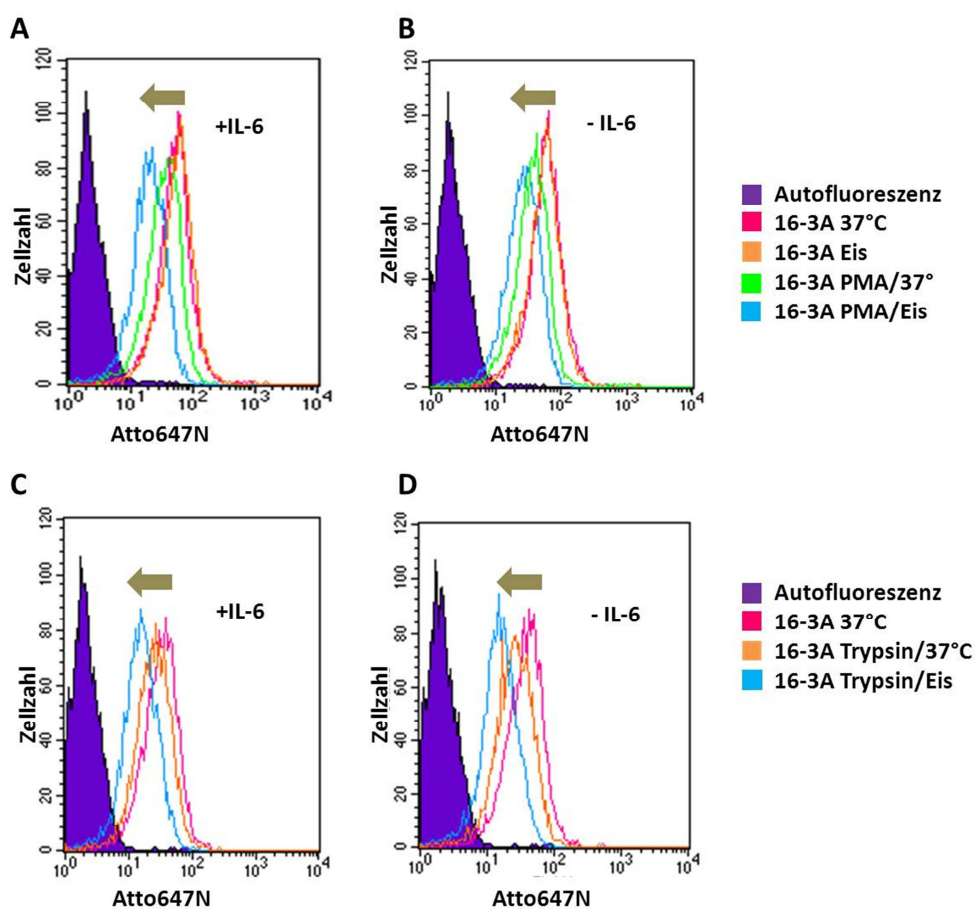


Abbildung 5-31: Analyse der Abhängigkeit der Aptamer-Internalisierung von IL-6.

Um die Abhängigkeit der Internalisierung von IL-6 zu untersuchen, wurden hIL-6R tragende BAF/3-Zellen mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N in An- bzw. Abwesenheit des Zytokins inkubiert. **(A/B)** Das *Shedding* des IL-6R konnte durch PMA stimuliert werden. Bereits internalisiertes Aptamer (37°) ist vom *Shedding* durch PMA/ADAM17 nicht betroffen. **(C/D)** Durch eine Inkubation mit Trypsin wurde an den IL-6R gebundenes Aptamer in der Zellmembran größtenteils entfernt. Wurden die Zellen mit dem Aptamer bei 37°C anstatt auf Eis inkubiert, fällt die Verschiebung der Fluoreszenz geringer aus.

Nach Inkubation der intensiv gewaschenen Zellen mit 16-3A (Atto647N-markiert) auf Eis konnte nach Trypsininierung/PMA-Behandlung in allen Proben eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität in niedrigere Bereiche im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen

gemessen werden. Wurden die Zellen hingegen bei 37°C mit 16-3A_Atto647N inkubiert, und der in der Zellmembran lokalisierte IL-6R durch PMA *gesheded* bzw. der Rezeptor durch Trypsin degradiert, fiel der Fluoreszenz-Shift geringer aus (Abbildung 5-31). Diese Ergebnisse standen somit im Einklang mit den Versuchen aus Abbildung 5-26. Die Auswertung der Experimente führt damit zu der Annahme, dass eine Internalisierung des Aptamers 16-3A über den IL-6R in keinem Abhängigkeitsverhältnis zu IL-6 steht.

5.7. Auswirkungen der Aptamerbindung auf den IL-6R Signalweg

5.7.1. Phosphorylierung von STAT3 nach IL-6-Stimulation

Nachdem sichergestellt war, dass eine Internalisierung des Aptamers über den IL-6R in die Zelllinie BAF/3_gp130_IL6R möglich war, sollte die Frage geklärt werden, welche Auswirkungen die Internalisierung für eine Zelle hat. Dabei sollte zunächst geklärt werden, ob gebundenes bzw. internalisiertes Aptamer in der Lage ist, die Signalkaskade eines stimulierten IL-6R auszulösen, was eine Phosphorylierung von STAT3 zur Folge hätte (1.4). Hierfür wurden BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen 5x mit 1x PBS (3.2) gewaschen und über Nacht in Abwesenheit von IL-6 kultiviert. Um jedoch das Wachstum der Zellen zu sichern, wurde dem Medium das Zytokin IL-3 zugesetzt, da in Abwesenheit von IL-6 BAF/3-Zellen von IL-3 abhängig sind (4.4.1). Darauf folgend wurden die Zellen in Anwesenheit von IL-3 bzw. IL-6 und dem Aptamer 16-3A für 24 h inkubiert. Als Kontrolle wurde die Punktvariante 16-3A_G17U ebenfalls als Probe eingesetzt. Die Phosphorylierung von mSTAT3 wurde mittels eines Western-Blots analysiert (4.3.3).

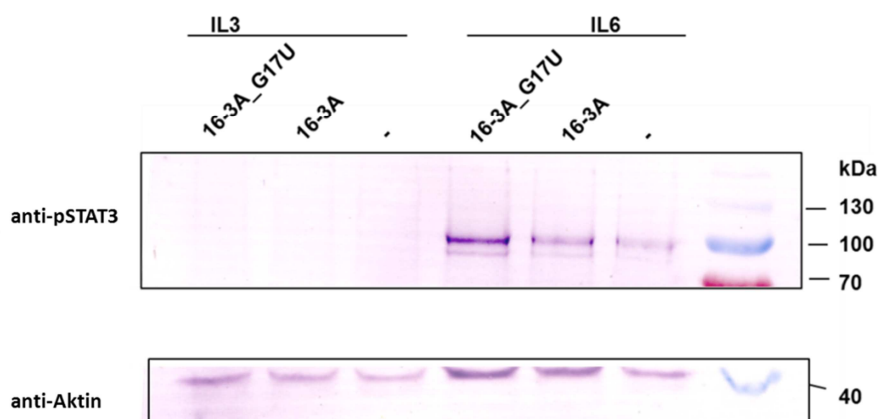


Abbildung 5-32: Analyse der Stimulation von mSTAT3 durch das Aptamer mittels Western-Blot.

Mehrfach mit PBS gewaschene BAF/3_gp130_IL-6R-Zellen wurden ÜN durch IL-3 stimuliert und ohne IL-6 inkubiert. Anschließend wurden je 500.000 Zellen erneut gewaschen und in Medium mit IL-3 oder IL-6 aufgenommen und in einer 24-Well-Platte ausgesät. Den Zellen wurde das Aptamer 16-3A, die Mutante G17U (je 200 nM) oder keine RNA zugesetzt und die Zellen für 24 h im Zellinkubator kultiviert. Die Zellen wurden mit 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und der Phosphorylierungsgrad von mSTAT3 mittels Western-Blot analysiert.

STAT3 kann seine Funktion als Transkriptionsfaktor erst nach erfolgter Phosphorylierung ausführen. Dies geschieht über Januskinasen, welche in Assoziation mit dem IL-6R in der Zelle vorliegen. Nach der Phosphorylierung folgt eine Dimerisierung von STAT3 und die Einwanderung in den Nukleus, wo Zielgene aktiviert werden (Abbildung 1-5). Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von IL-6 zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 führt, unabhängig vom Zusatz des Aptamers bzw. der Mutante (Abbildung 5-32). Hier ist in allen drei Spuren eine Bande auf Höhe von ~ 90 kDa zu sehen. Im Vergleich dazu führte die Anwesenheit des Aptamers 16-3A zu keinem detektierbaren Signal, wenn kein IL-6 im Medium vorhanden war.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein Proliferations-Test mit Hilfe des alamarBlue®-Reagenz (4.4.5) an hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen durchgeführt. Reste von IL-6 wurden durch wiederholte Waschschrte vom IL-6R gelöst und die Zellen ÜN in einer 96-Well Platte mit IL-3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von IL-6 (10 ng/mL) und dem Aptamer (200 nM) inkubiert. Nach 24 h wurde das Reagenz hinzugefügt und nach weiteren 4 h Inkubation die Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei ist die Höhe der Fluoreszenzintensität ein Maß für die Proliferationsrate.

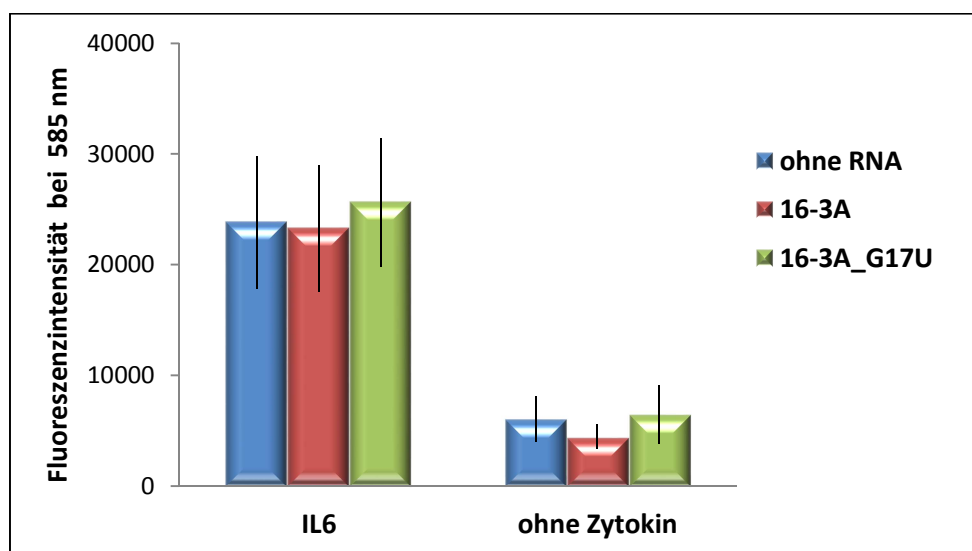


Abbildung 5-33: Proliferations-Test für die Stimulation von STAT3:

Die Auswirkungen der Aptamer-Bindung auf die Stimulation von mSTAT3 wurden analysiert. Gezeigt sind die Werte einer Dreifach-Bestimmung. Nur nach Stimulation von mSTAT3 sind die Zellen in der Lage zu proliferieren, was sich in einer hohen Fluoreszenz widerspiegelt. Im Gegensatz zu IL-6 ist das Aptamer 16-3A dazu nicht in der Lage.

Wie aus Abbildung 5-33 ersichtlich, war das Aptamer 16-3A ohne den Zusatz des Zytokins IL-6 nicht dazu fähig, die Stimulation von STAT3 und damit die Proliferation zu initiieren. Die Proliferationsrate lag im selben niedrigen Bereich wie die Kontroll-Probe ohne Zusatz von

RNA. Die Mutante 16-3A_G17U zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Die Rate des Zellwachstums in Anwesenheit von IL-6 war unabhängig vom Zusatz des Aptamers.

5.7.2. Analyse möglicher zytotoxischer Einflüsse nach Aptamerbindung

Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer mit hoher Spezifität und Affinität an den nativen IL-6 Rezeptor bindet (5.5). Weiterhin wurden Hinweise erhalten, dass das Aptamer nicht nur an die Zellen bindet, sondern auch von diesen spezifisch über den IL-6 Rezeptor aufgenommen wird (5.6). Um das Aptamer in späteren Anwendungen eventuell als *Delivery*-Vehikel nutzen zu können, musste zunächst die Frage nach möglichen toxischen Einflüssen des Aptamers auf die Zellen geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden erneut BAF/3-Zellen als Studienobjekt gewählt. Die Zellen wurden mit Selektionspuffer gewaschen und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Aptamers in Medium ohne FKS bei 37°C inkubiert (4.4.5). Nach 2 h wurde FKS dem Medium hinzugefügt und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Der Grad der Zellvitalität wurde mit Hilfe des alamarBlue®-Reagenzes bestimmt, welches von stoffwechselaktiven Zellen zu einem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt wird. Dabei wurden die Werte mit unbehandelten Zellen in Relation gesetzt (normiert), deren Zellvitalität auf 100% festgelegt wurde. Als Kontroll-Substanz wurde das Antibiotikum Cycloheximid verwendet, welches die Translation von Eukaryoten hemmt.

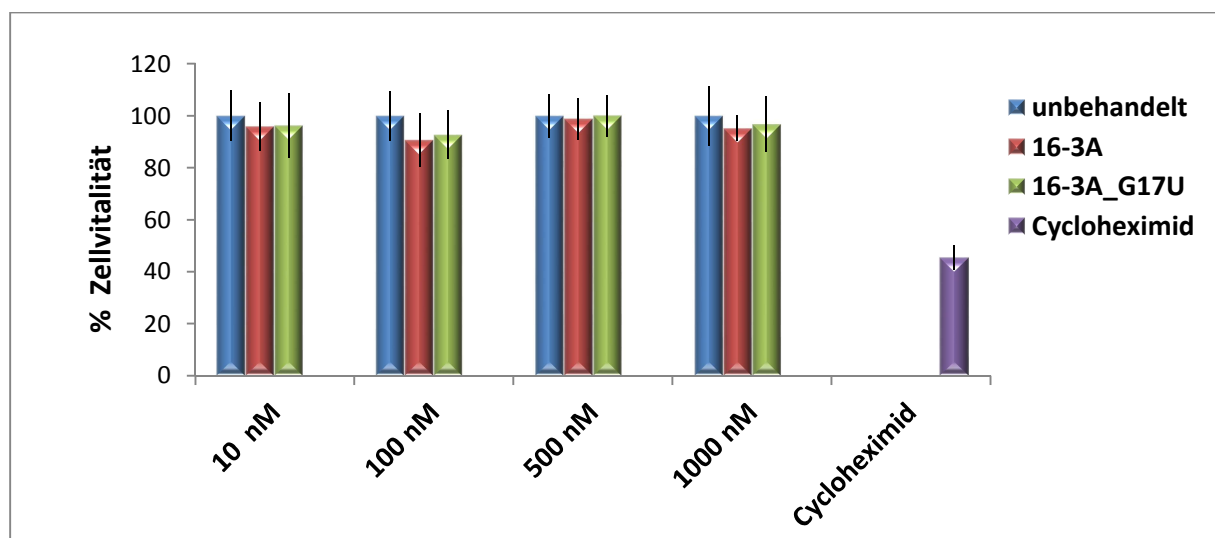


Abbildung 5-34: Zytotoxizitätstest.

Um mögliche schädliche Einflüsse des Aptamers 16-3A auf eukaryotische Zellen zu untersuchen, wurden BAF/3-Zellen welche den hIL-6 Rezeptor exprimieren mit steigenden Konzentrationen des Aptamers zunächst in Serum ohne FKS inkubiert, um eine Bindung bzw. Internalisierung des Aptamers zu gewährleisten. Dem Medium wurde nach 2 h Inkubationszeit FKS mit einer finalen Konzentration von 10% hinzugefügt und für weitere 48 h inkubiert. Die Zellvitalität wurde auf unbehandelte Zellen normiert und mittels alamarBlue®-Reagenz bestimmt, welches von proliferierenden Zellen zu einem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt wird.

Wie in Abbildung 5-34 zu erkennen, hatte das Aptamer 16-3A keinen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von BAF/3-Zellen. Auch bei hohen Aptamer-Konzentrationen (1 μ M) lag die Proliferationsrate der behandelten Zellen bei $\sim$ 100% im Vergleich zu den Referenzzellen. Wurde den Zellen jedoch das Toxin Cycloheximid zugesetzt, lag die Proliferationsrate nur noch bei etwa 50%. Eine Proliferations-steigernde Wirkung wurde zudem nicht beobachtet.

5.8. Bindung an die D3-Domäne

In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Aptamer 16-3 nicht mit dem Zytokin IL-6 um die Bindestelle am Hyper-IL-6 konkurriert. Ebenso hat die Anwesenheit von sgp130 keinen Einfluss auf die Bindung zwischen dem Designer-Protein Hyper-IL-6 und dem Aptamer [6]. Es ist bekannt, dass IL-6 im Bereich zwischen der D2 -und der D3-Domäne an den IL-6-Rezeptor bindet und die Komplexbildung mit gp130 ebenfalls zwischen diesen Domänen des Rezeptors lokalisiert ist [18]. Da die Anwesenheit von IL-6 und gp130 keinen Einfluss auf die Aptamerbindung an Hyper-IL-6 hat, wurde angenommen, dass die Bindung des Aptamers an den IL-6R wahrscheinlich im Bereich der D1 Domäne stattfindet. Um eine Wechselwirkung mit der D3-Domäne auszuschließen, wurde eine Filterbindungsstudie (4.5.1) mit der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rose-John (Universität Kiel) produzierten Domäne D3 und dem radioaktiv markiertem Aptamer (4.2.6) durch-geführt. Als Kontroll-RNA wurde der transkribierte Pool aus Runde 1 aus der SELEX von Dr. Cindy Meyer verwendet [6], welcher in einer radioaktiven T7-Transkription unter Einbau von α -³²P-GTP erhalten wurde. Das Aptamer wurde zum einen nach der Markierung lediglich über eine Biospin-P6-Säule gereinigt, zum anderen präparativ über denaturierende PAGE (4.1 ff).

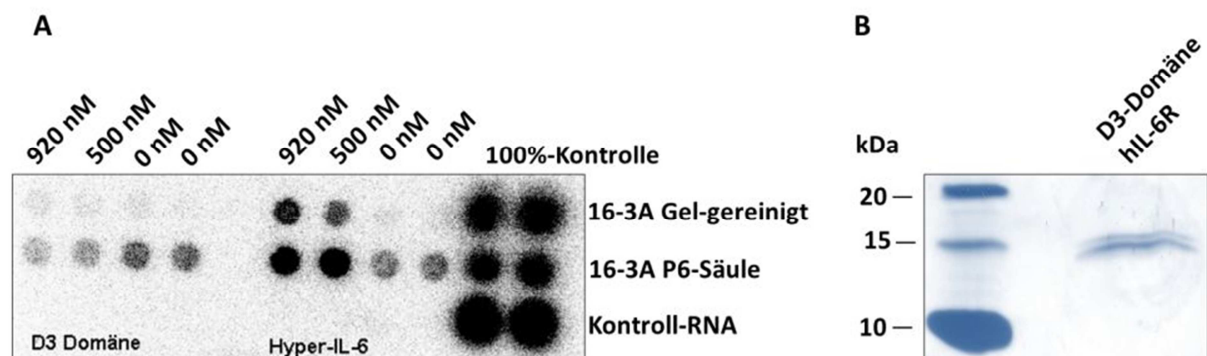


Abbildung 5-35: Analyse der Bindung des Aptamers 16-3A an die D3-Domäne von hIL-6R mittels Filterbindungsstudie.

(A) Das radioaktiv markierte Aptamer bzw. die Kontroll-RNA wurden mit Hyper-IL-6 und der D3-Domäne des hIL-6R in Selektionspuffer für 30 min inkubiert und einer über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Auf der Membran verbliebene RNA wurde mittels Autoradiographie visualisiert. Lediglich bei einer Inkubation mit dem Protein Hyper-IL-6 zeigte sich eine spezifische Schwärzung der Membran. (B) Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE-Gels (15%) auf das 500 ng der D3-Domäne des hIL-6R aufgetragen wurden.

Wie erwartet, zeigte sich keine Schwärzung der Membran, sofern das Aptamer lediglich mit der D3-Domäne des Aptamers inkubiert wurde. Die Kontroll-RNA zeigte keine unspezifische Bindung, weder zu Hyper-IL-6 noch zur D3-Domäne. Auffällig ist die relativ schwarze Färbung beim Aptamer, welches nur über eine Biospin-P6-Säule gereinigt wurde, sogar wenn kein Protein vorhanden war. Dies lässt sich vermutlich auf verbliebenes freies γ -³²P-ATP in der Probe zurückführen und verdeutlicht die Notwendigkeit einer Gelreinigung. Somit konnte eine Bindung des Aptamers 16-3A zur D3-Domäne des IL-6R ausgeschlossen werden.

5.9. Studien der Konkurrenz zwischen dem Aptamer 16-3A und einem anti-IL-6-Rezeptor Antikörper um die Bindung an den IL-6R

Einen weiteren Hinweis auf die mögliche Bindungsstelle des Aptamers an den IL-6R sollten Wettbewerbsstudien mit einem monoklonalen Antikörper liefern. Hierfür wurde der Maus-Antikörper anti-IL-6R (Klon B-R6) (3.7) verwendet, welcher die Komplexbildung zwischen gp130, IL-6 und der α -Kette vom IL-6 Rezeptor verhindert [141].

Für dieses Experiment wurden BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen zunächst mit dem Primärantikörper inkubiert und anschließend gewaschen (4.4.3.1). Es folgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Aptamer (4.4.3.3), mehrere Waschschrirte und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Ebenso wurde die Reihenfolge der Inkubation umgekehrt und zunächst das Aptamer mit den Zellen inkubiert. Eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten zu höheren Werten zeigte die Bindung des markierten Aptamers bzw. des Antikörpers an den hIL-6R-tragenden Zellen. Dabei kompetierte der monoklonale Antikörper nicht um die Bindungsstelle an den hIL-6R mit dem Aptamer. Eine vorangegangene Inkubation des Antikörpers veränderte den Fluoreszenz-Shift durch das gebundene Aptamer nicht (Abbildung 5-36 B). Wurden die Zellen zuerst mit dem Aptamer inkubiert, konnte der hIL-6R im Anschluss noch genauso effizient an die Zellen binden, als wenn kein Aptamer hinzugefügt wurde (Abbildung 5-36 A). Dabei spielte es keine Rolle, welche von beiden Komponenten im Überschuss in der Lösung vorhanden war.

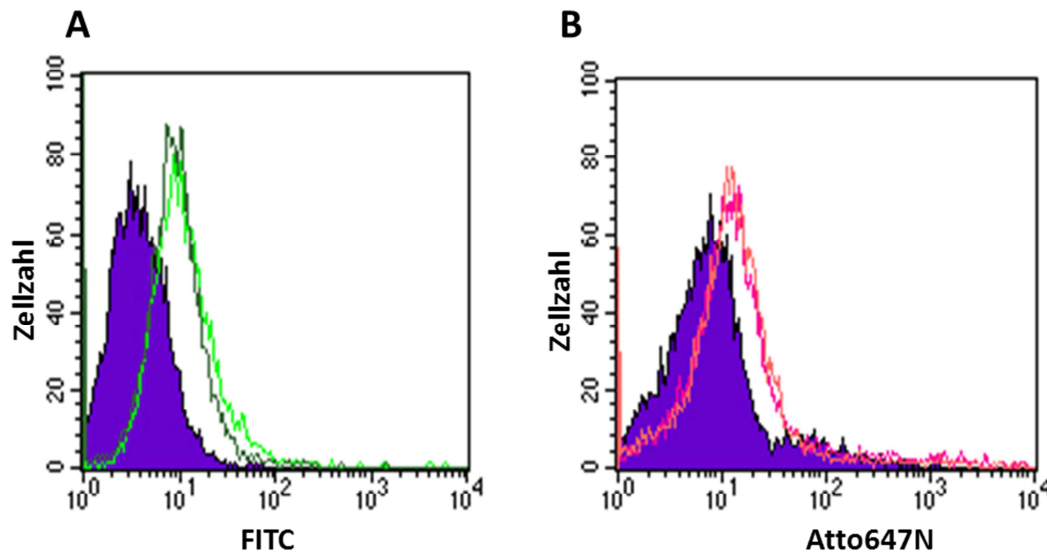


Abbildung 5-36: Durchflusszytometrische Analyse der Konkurrenz zwischen dem Aptamer 16-3A und einem hIL-6R-spezifischen Antikörper um die Bindung an BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen.

Nach der Messung der Fluoreszenzintensitäten von je 10.000 unmarkierten Zellen (blaue Integrale, ■) wurde die Expression des hIL-6R durch Bindung des anti-hIL-6R Ak in Kombination mit einem Sekundär-Ak mit APC Markierung (**A**, ■) bzw. durch die Bindung des Aptamers 16-3A_Atto647N (**B**, ■) nachgewiesen. Eine vorherige Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper ändert nicht die Bindung des Aptamers an den nativen hIL-6R (**B**, ■). Das Aptamer 16-3A blockierte nicht die Bindungsstelle für den murinen Antikörper anti-hIL-6R (**A**, ■).

5.10. Verwendung der Aptamere als Delivery-Vehikel von siRNAs zur Zelltyp-spezifischen Aufnahme ins Zellinnere

5.10.1. Konstruktion von Aptamer-siRNA-Chimären

Nachdem mittels FACS Analysen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen klare Hinweise auf eine Internalisierung des Aptamers erhalten wurden, sollte nun ein weiterer Nachweis hierfür erfolgen. Das Aptamer sollte kovalent mit einer siRNA verbunden werden, welche ihre Funktionalität erst *in vivo* entfalten kann. Mittels RNA-Interferenz sollte die Produktion des Zielproteins mSTAT3 bzw. mSTAT5 in BAF/3-Zellen runterreguliert werden.

Die Aptamer-siRNA-Chimären wurden so konstruiert, dass sie mittels T7-Transkription produziert werden konnten. Dies bedeutete, dass am 5'-Ende die Sequenz mit GG beginnen musste, was die Auswahl an möglichen siRNA-Sequenzen einschränkte. Somit konnte nicht auf bereits veröffentlichte Sequenzen mit Ziel murines STAT3/5 zurückgegriffen werden, sondern es wurde der *siRNA-target finder* (Ambion, [142]) zu Hilfe genommen. Für jedes Zielprotein wurden sechs verschiedene Aptamer-siRNA-Chimären designt. Eine Übersicht der verschiedenen Konstrukte ist in Tabelle 5-6 wiedergegeben.

Tabelle 5-6: Übersicht der Aptamer-siRNA-Chimären.

Name	DNA-Oligo für Hybridisierung	Beschreibung
siRNA1_mSTAT3	siRNA1_mSTAT3	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer potentiellen siRNA gegen murines STAT3
siRNA2_mSTAT3	siRNA2_mSTAT3	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer potentiellen siRNA gegen murines STAT3
con_siRNA1_mSTAT3	con_siRNA1_mSTAT3	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer <i>scrambled</i> Sequenz von siRNA1_mSTAT3
con_siRNA2_mSTAT3	con_siRNA2_mSTAT3	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer <i>scrambled</i> Sequenz von siRNA2_mSTAT3
G17U-siRNA1_mSTAT3	G17U-siRNA1_mSTAT3	Chimär aus der Punktvariante 16-3A_G17U und der Sequenz von siRNA1_mSTAT3
G17U-siRNA1_mSTAT3	G17U-siRNA2_mSTAT3	Chimär aus der Punktvariante 16-3A_G17U und der Sequenz von siRNA2_mSTAT3
siRNA1_mSTAT5	siRNA1_mSTAT5	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer potentiellen siRNA gegen murines STAT5
siRNA2_mSTAT5	siRNA2_mSTAT5	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer potentiellen siRNA gegen murines STAT5
con_siRNA1_mSTAT5	con_siRNA1_mSTAT5	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer <i>scrambled</i> Sequenz von siRNA1_mSTAT5
con_siRNA2_mSTAT5	con_siRNA2_mSTAT5	Chimär aus dem Aptamer 16-3A und einer <i>scrambled</i> Sequenz von siRNA2_mSTAT5
G17U-siRNA1_mSTAT5	G17U-siRNA1_mSTAT5	Chimär aus der Punktvariante 16-3A_G17U und der Sequenz von siRNA1_mSTAT5
G17U-siRNA1_mSTAT5	G17U-siRNA2_mSTAT5	Chimär aus der Punktvariante 16-3A_G17U und der Sequenz von siRNA2_mSTAT5

Dabei unterschieden sich die jeweiligen siRNAs Nr. 1/2 in der Zielsequenz auf mRNA Ebene. Als Kontrollen wurden die siRNAs mit der Punktvariante 16-3A_G17U fusioniert, welche nicht an den hIL-6R bzw. Hyper-IL6 binden sollte. Als weitere Kontrolle wurden die jeweiligen Sequenzen der siRNAs durcheinandergewürfelt (*scrambled*). So sollte eine spezifische Bindung an den hIL-6R möglich, jedoch kein *Silencing*-Effekt, zu beobachten sein, da keine Zielsequenz auf der mRNA angesteuert werden kann.

5.10.2. Sekundärstrukturanalyse mittels mfold

Um einen Anhaltspunkt über die Struktur der Chimären zu erhalten, wurde mit Hilfe des *Mfold Web Servers* [137, 138] eine zweidimensionale Strukturvorhersage durchgeführt und mit dem Aptamer 16-3A verglichen (Abbildung 5-37).

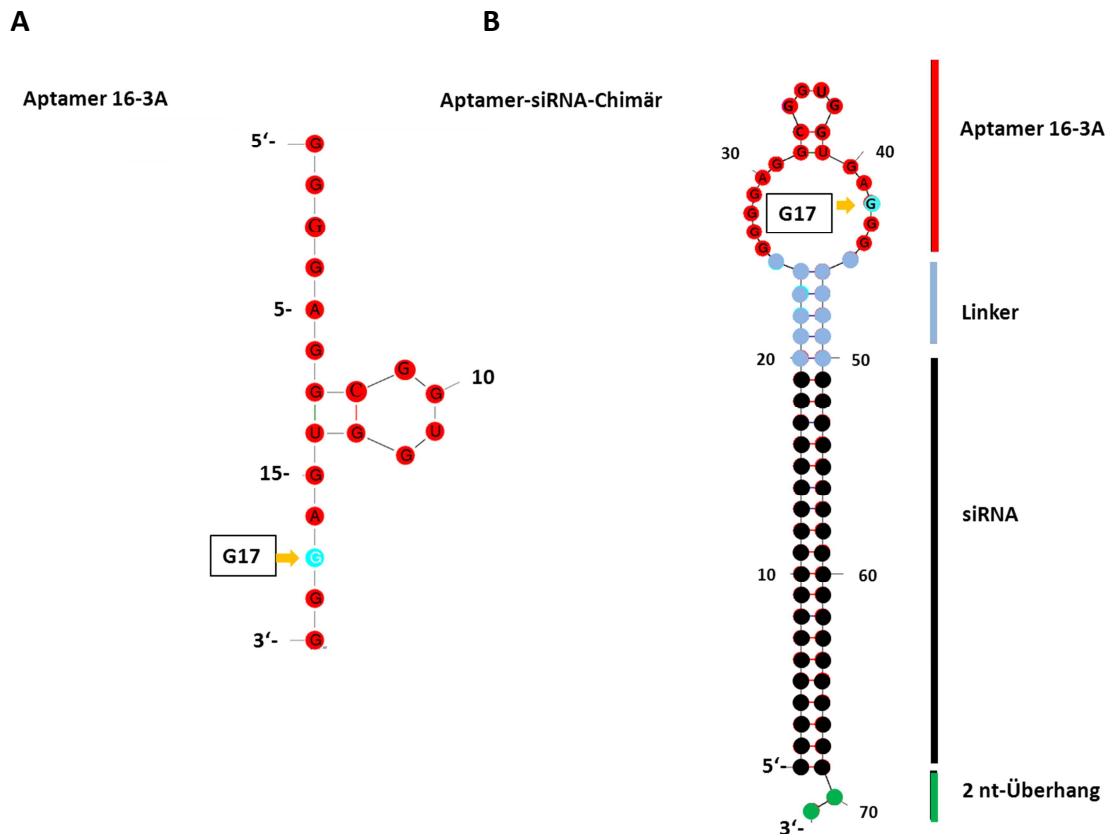


Abbildung 5-37: Sekundärstrukturanalyse des Aptamers 16-3A und der Aptamer-siRNA-Chimäre.

Die Sequenzen der RNAs 16-3A und siRNA1_mSTAT3 wurden in die Maske des *mfold*-Servers (*RNA folding form*) eingegeben [137] und die stabilste Sekundärstruktur bei einer Faltungstemperatur von 37°C ausgewählt. **(A)** Aptamer 16-3A; **(B)** siRNA1_mSTAT3.

Dabei zeigte sich, dass das offene Aptamer über eine Linkersequenz von sechs Basen mit der doppelsträngigen siRNA verbunden war. Das 3'-Ende enthielt einen 2 Nukleotid Überhang, um ein effizientes Prozessieren durch Dicer zu ermöglichen. Für alle designten und produzierten Konstrukte wurde die gleiche Sekundärstruktur vorausgesagt (nicht gezeigt).

Für die Transkription wurden die *reverse*-komplementären DNA-Stränge (Tabelle 3-6) mit dem DNA-Oligonukleotid für den T7-Primer hybridisiert (4.2.1) und mittels T7-Transkription die Aptamer-siRNA-Chimären produziert (4.2.2) (Abbildung 5-1). Nach einer PAGE unter denaturierenden Bedingungen (10% PAA) (4.1.1) wurden die Konstrukte mittels UV-*Shadowing* visualisiert (4.1.4) und über Diffusionselution (4.1.7) aus dem Gel präpariert. Als Größenorientierung diente dabei ein 67 nt langes DNA-Fragment, welches mit auf das Gel

aufgetragen wurde. Nach erfolgter Alkoholpräzipitation (4.1.9) wurden die gereinigten Chimären mittels eines 10%-igen denaturierenden Gels kontrolliert. Beispielhaft ist ein Kontrollgel für die Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3 und STAT5 gezeigt (Abbildung 5-38).

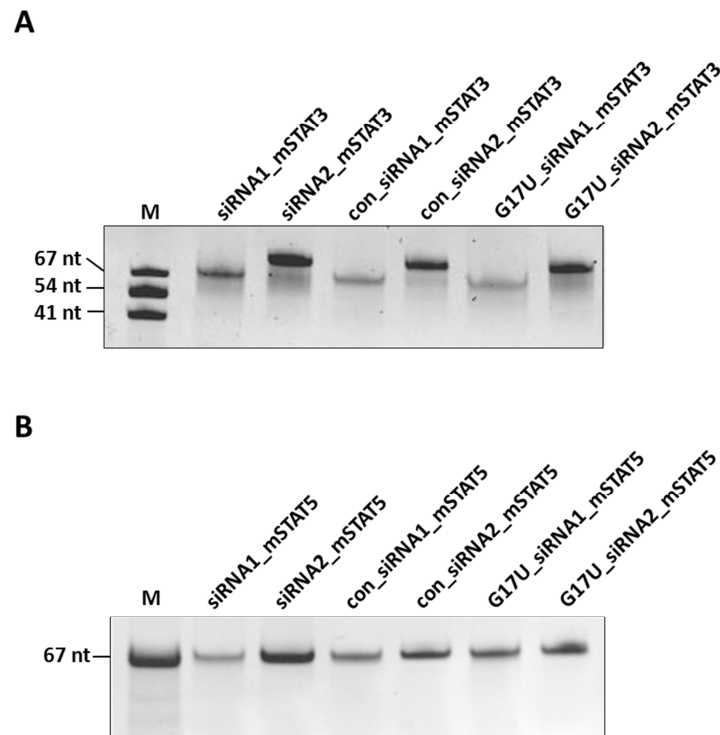


Abbildung 5-38: 10%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel zur Kontrolle der siRNA-Aptamer-Chimäre.

Nach Hybridisierung des Oligonukleotids für die T7-RNA-Polymerase-Bindestelle wurden die Konstrukte ÜN bei 37°C von der T7-RNA-Polymerase transkribiert und über präparative PAA-Gelelektrophorese gereinigt. Die fertig präparierten RNAs wurden final mittels denaturierender PAGE (10% PAA-Gel) überprüft und mittels Ethidiumbromid visualisiert. Dabei wurden chemisch synthetisierte Oligonukleotide als Größenreferenz eingesetzt. **(A)** Aptamer-siRNA-Chimäre für mSTAT3. **(B)** Aptamer-siRNA-Chimäre für mSTAT5.

Die Aptamer-siRNA-Fragmente konnten in hoher Ausbeute produziert und als singuläre Banden auf einer Höhe von ~ 67 nt detektiert werden. Dabei zeigten die Chimären von siRNA1_mSTAT3 ein etwas schnelleres Laufverhalten im Gel als die Chimären von siRNA2_mSTAT3. Die Konstrukte für den Knockdown von murinem STAT5 wiesen ein homogenes Laufverhalten auf.

5.10.3. Filterbindungsstudien zur Analyse der Interaktion zwischen den Aptamer-siRNA-Chimären und Hyper-IL-6

Nachdem die Aptamer-siRNA-Chimären erfolgreich produziert und gereinigt werden konnten, sollte zunächst in radioaktiven Filterbindungsstudien *in vitro* die Bindung zu Hyper-

IL-6 nachgewiesen werden. Dafür wurden die Konstrukte zunächst dephosphoryliert (4.2.5) und am 5'-Ende mit dem radioaktiven Isotop γ - ^{32}P -ATP markiert (4.2.6). Um nicht eingebautes γ - ^{32}P -ATP zu entfernen wurden die Proben über 10%-ige präparative Gele getrennt (4.1.1) und über Autoradiographie visualisiert (4.1.5). Die entsprechenden Gelstücke wurden ausgeschnitten, die RNA über Diffusionselution eluiert (4.1.7) und mittels Isopropanol gefällt (4.1.9). Die fertig präparierten radioaktiv markierten Chimäre wurden abschließend auf einem denaturierenden Kontrollgel überprüft (Abbildung 5-39 & Abbildung 5-40).

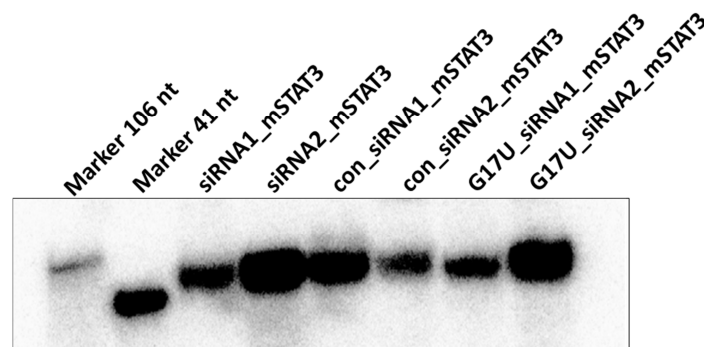


Abbildung 5-39: Kontrolle der radioaktiv markierten Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 mittels denaturierender PAGE.

Die Chimären aus Aptamer und siRNA gegen mSTAT3 wurden mittels T7-Transkription produziert und präparativ gereinigt. Es folgte eine radioaktive Markierung am 5'-Ende über die T4-PNK und eine erneute präparative PAGE. In einem 10%-igen denaturierenden PAA-Gel wurde je 1 μL der mit γ - ^{32}P -ATP markierten präparierten Chimären für murines STAT3 final kontrolliert. Als Größenstandard diente ein 41 nt und ein 106 nt langes RNA-Fragment. Die Proben wurden mittels Autoradiographie detektiert.

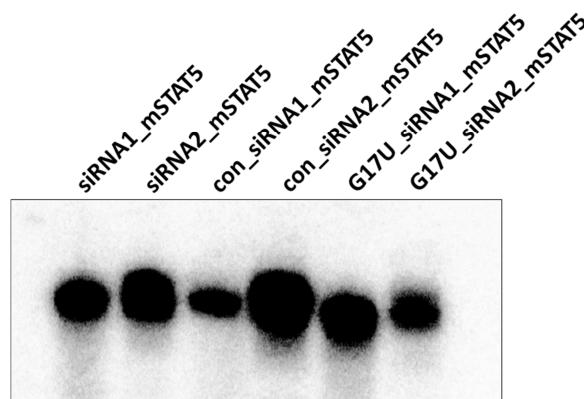


Abbildung 5-40: Kontrolle der radioaktiv markierten Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT5 mittels denaturierender PAGE.

Die Chimären aus Aptamer und siRNA gegen mSTAT5 wurden mittels T7-Transkription produziert und präparativ gereinigt. Es folgte eine radioaktive Markierung am 5'-Ende über die T4-PNK und eine erneute präparative PAGE. In einem 10%-igen denaturierenden PAA-Gel wurde je 1 μL der mit γ - ^{32}P -ATP markierten präparierten Chimären für murines STAT3 final kontrolliert. Die Proben wurden mittels Autoradiographie detektiert.

Die erfolgreich mit γ - ^{32}P -ATP markierten Aptamer-siRNA-Chimären konnten folglich für Bindungsanalysen mittels analytischen Filterbindungsstudien (4.5.1) eingesetzt werden.

Dabei wurde eine konstante Menge an markierter RNA (< 2 nM) mit steigenden Konzentrationen (0-500 nM) des Zielproteins Hyper-IL-6 inkubiert. Die Proben wurden über eine Nitrozellulosemembran filtriert, wodurch ungebundene RNA zusätzlich durch stringentes Waschen entfernt wurde. Die verbliebene Menge radioaktiv markierter RNA wurde mittels Autoradiographie (4.1.5) detektiert und mit der Software Quantity One® quantifiziert. Beispielhaft ist in Abbildung 5-41 eine der durchgeführten Filterbindungsstudien gezeigt.

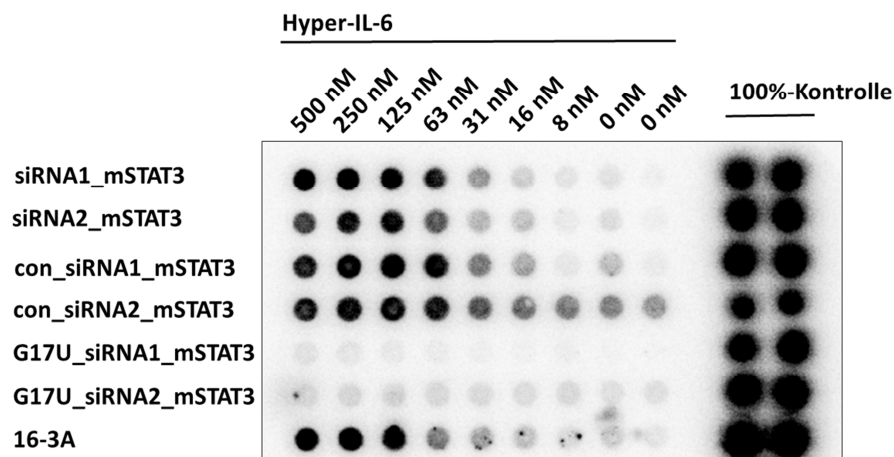


Abbildung 5-41: Filterbindungsstudie Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.

Die am 5'-Ende radioaktiv markierten Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3 wurden mit steigenden Konzentrationen des Zielproteins Hyper-IL-6 (0-500 nM) inkubiert und über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Die Proben wurden mittels Autoradiographie analysiert, dabei zeigte sich gebundene RNA durch eine Schwärzung der Membran. Als Referenz wurde in doppelter Ausführung die eingesetzte Gesamtmenge je Well aufgetragen (100%-Kontrolle).

In den Filterbindungsstudien wies eine zunehmende Schwärzung der Membran bei zunehmender Konzentration an HIL-6 auf eine konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und dem Designer-Zytokin hin. Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Bindung wurde je eine 100-200%-Kontrolle, welche in zweifacher Ausführung auf die Membran aufgetragen wurde, herangezogen. Die graphische Auswertung der Ergebnisse und die Berechnung der K_d -Werte sowie den Anteil der maximalen Bindung wurden mit der Software GraphPad Prism4® vollzogen (Abbildung 5-42).

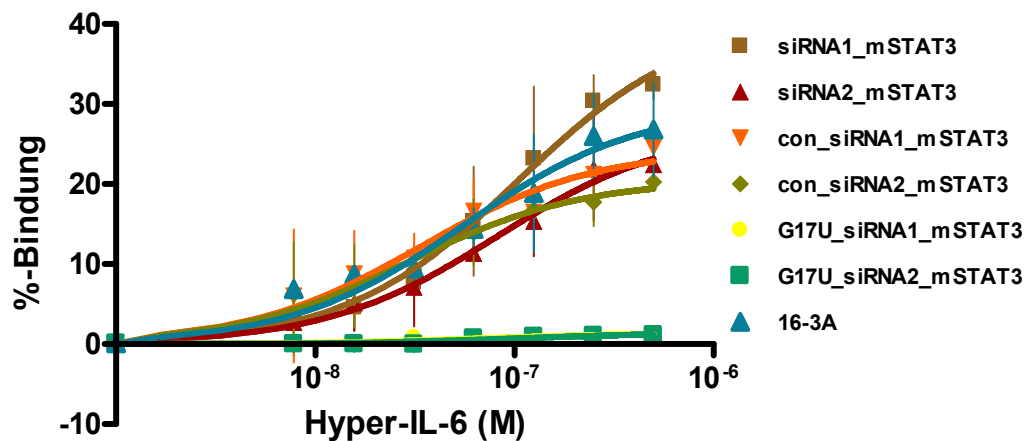


Abbildung 5-42: Auswertung der Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 und Hyper-IL-6.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen der prozentualen Anteile an gebundener RNA in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von Hyper-IL-6 (0-500 nM) in logarithmischer Auftragung. Die Berechnung der Graphen erfolgte nach einem *one-to-one*-Bindungsmodell.

Aus den Bindungsstudien wurde ersichtlich, dass die Chimären, sofern sie das Aptamer 16-3A enthielten, das in Lösung befindliche Zielmolekül Hyper-IL-6 mit vergleichbarer Affinität binden konnten. Die ermittelten K_d -Werte lagen dabei in der Größenordnung von 30-100 nM und der Anteil der maximalen Bindung bei 20-40% (Tabelle 5-7). Wurde in die Konstrukte die Punktmutation G17U eingebaut, führte dies zu einem vollständigen Verlust der Bindung.

Tabelle 5-7: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus den Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3.

Name	Anteil maximaler Bindung [%]	K_d [nM]	R^2
16-3A	30,5 ± 3,2	66,6 ± 21,7	0,915
siRNA1_mSTAT3	40,9 ± 2,0	104,7 ± 13,9	0,992
siRNA2_mSTAT3	27,0 ± 1,3	82,3 ± 11,2	0,990
con_siRNA1_mSTAT3	24,3 ± 1,5	33,8 ± 7,4	0,966
con_siRNA2_mSTAT3	20,6 ± 0,9	29,4 ± 5,0	0,978
G17U_siRNA1_mSTAT3	1,4 ± 0,3	k.A.	/
G17U_siRNA2_mSTAT3	1,5 ± 0,4	k.A.	/

Die Filterbindungsstudien wurden analog ebenfalls für die siRNA-Aptamer-Chimären für murines STAT5 durchgeführt.

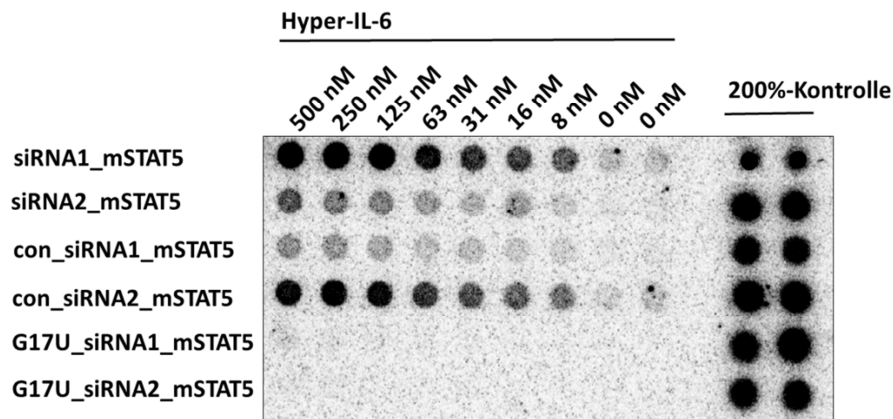


Abbildung 5-43: Analyse der Bindung mittels radioaktiven Filterbindungstests der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT5. Gezeigt ist ein Beispiel eines durchgeführten Filterbindungstests. Dabei wurde eine konstante Menge mit γ - 32 P markierter RNA mit steigenden Konzentrationen HIL-6 (0-500 nM) in Selektionspuffer inkubiert und anschließend über eine Nitrozellulosemembran filtriert. Der Grad der Schwärzung gibt dabei den auf der Membran verbliebenen Anteil an RNA an, dieser wurde mittels Autoradiographie detektiert.

Wie anhand Abbildung 5-43 zu erkennen, konnte keine Wechselwirkung zwischen den Chimären mit der Punktvariante 16-3A_G17U und Hyper-IL-6 beobachtet werden. Hingegen wurde für die Chimären (mSTAT5) mit dem Aptamer 16-3A eine zunehmende Schwärzung der Membran bei steigender Proteinkonzentration detektiert, was auf eine konzentrationsabhängige Bindung schließen lässt. Der Grad der Schwärzung wurde mittels QuantityOne® quantifiziert und die Mittelwerte der prozentualen Bindung mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus den Versuchen berechnet. Die konzentrationsabhängige Bindung der Chimäre für mSTA5 ist in Abbildung 5-44 graphisch dargestellt.

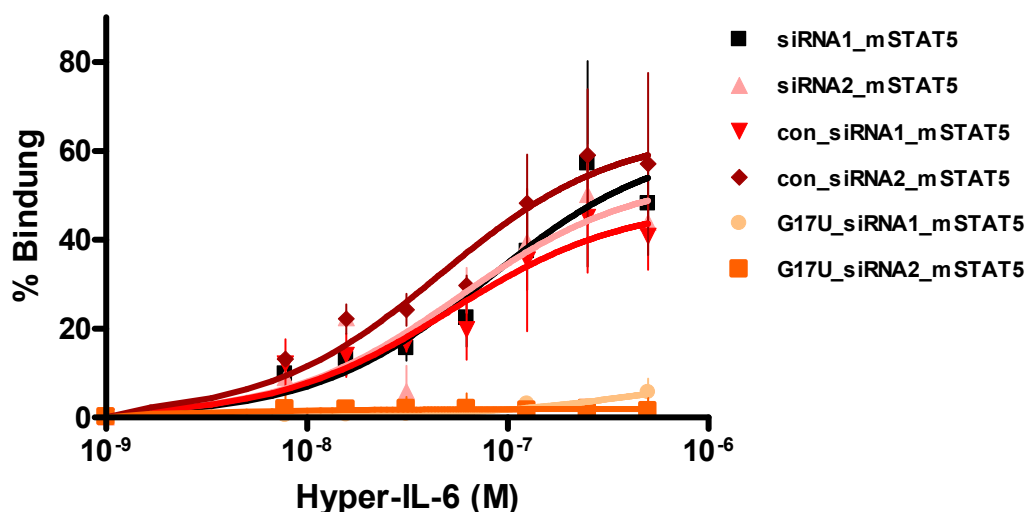


Abbildung 5-44: Auswertung der Filterbindungsstudien der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT5 an Hyper-IL-6. Der Anteil der prozentualen Bindung der radioaktiv markierten RNA an Hyper-IL-6 wurde in Filterbindungsstudien ermittelt und gegen die Proteinkonzentration von Hyper-IL-6 (0-500 nM) aufgetragen. Die Daten wurden mittels eines *one-to-one* Bindungsmodells gefittet. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Messungen.

In den analytischen Filterbindungsstudien zeigte sich, dass die Aptamer-siRNA-Chimären sowohl für murines STAT3 als auch für murines STAT5 mit hoher Affinität an das Protein Hyper-IL-6 binden konnten. Dabei verlief die Bindung konzentrationsabhängig und ähnlich zum Aptamer 16-3A. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Chimären für mSTAT5 sind in Tabelle 5-8 wiedergegeben.

Tabelle 5-8: Anteil maximaler Bindung und ermittelter K_d -Werte der Chimäre für mSTAT5 aus Filterbindungsstudien.

Name	Anteil maximaler Bindung [%]	K_d [nM]	R^2
16-3A	30,5 ± 3,2	66,6 ± 21,7	0,915
siRNA1_mSTAT5	62,5 ± 7,5	80,0 ± 28,5	0,934
siRNA2_mSTAT5	54,4 ± 8,9	57,4 ± 30,0	0,83
con_siRNA1_mSTAT5	48,2 ± 4,9	52,2 ± 17,4	0,929
con_siRNA2_mSTAT5	64,4 ± 4,9	46,3 ± 11,8	0,958
G17U_siRNA1_mSTAT5	10,4 ± 5,0	k.A.	/
G17U_siRNA2_mSTAT5	1,9 ± 0,2	k.A.	/

5.10.4. Fluoreszenz-Markierung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3

Nachdem in radioaktiven Filterbindungsstudien *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die kovalente Verknüpfung von siRNA-Sequenzen an das Aptamer 16-3A keine Auswirkung auf die Affinität des Aptamers zum Zielprotein hervorrief, sollte die Bindung der Chimären zum membranständigen IL-6R überprüft werden. Hierfür war es zunächst erforderlich, die Chimären mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu versehen. Dazu wurde die Transkription unter Verwendung des GTP-Analogons GTPS (Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) durchgeführt und das Fluorophor Alexa647® als aktivierte Maleimidverbindung kovalent an die RNA gebunden (4.2.4). Zur Abtrennung von nicht eingebautem Fluorophor wurde die RNA präparativ (4.1.1 ff) über ein denaturierendes Gel gereinigt und der Erfolg der Fluoreszenzmarkierung auf einem denaturierenden 10%-igen PAA-Gel kontrolliert.

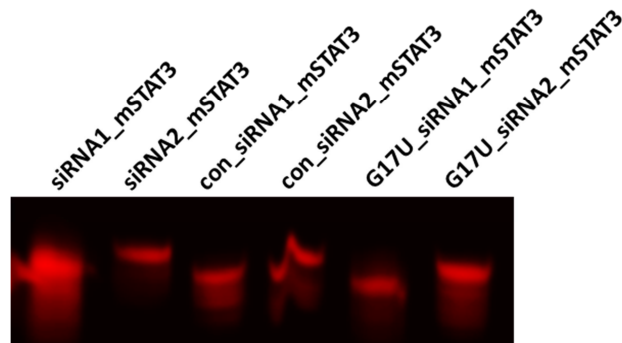


Abbildung 5-45: Kontrollgel Fluoreszenz markierter Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.

Die Aptamer-siRNA-Konstrukte wurden mittels *in vitro* T7-Transkription produziert, wobei GTPS an Stelle von Guanosin zugesetzt war. Die kovalente Verknüpfung des Fluorophors-Maleimid konnte so erfolgen. Nach einer präparativen Gelreinigung wurden die RNAs final in einem 10%-igen PAA-Gel kontrolliert und mittels eines Fluoreszenzimagers visualisiert (Wellenlänge 633 nm).

Unter Verwendung des Geldokumentationssystems Typhoon 9410 wurde mit einem Helium-Argon-Laser die Proben im Gel bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt (4.1.6). In dem Kontrollgel (Abbildung 5-45) konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647® bei allen Proben erfolgreich durchgeführt wurde. Die markierten Nukleinsäuren konnten daraufhin für die Analyse der Bindung der Chimären an den nativen IL-6R eingesetzt werden.

5.10.5. Bindung der Aptamer-siRNA-Chimären an den nativen IL-6-R auf BAF/3-Zellen

Für die Untersuchung der Bindung an den membranständigen IL-6-Rezeptor wurde die murine prä-B-Zelllinie BAF/3 verwendet, welche stabil mit der cDNA für gp130 und den hIL-6R transfiziert war (3.10). Die Analyse der Bindung zwischen den Aptamer-siRNA-Chimären und dem Rezeptor erfolgte mittels Durchflusszytometrie (4.4.3.3). Dabei lag die Konzentration der Fluoreszenz-markierten Chimären bei 3-6 nM.

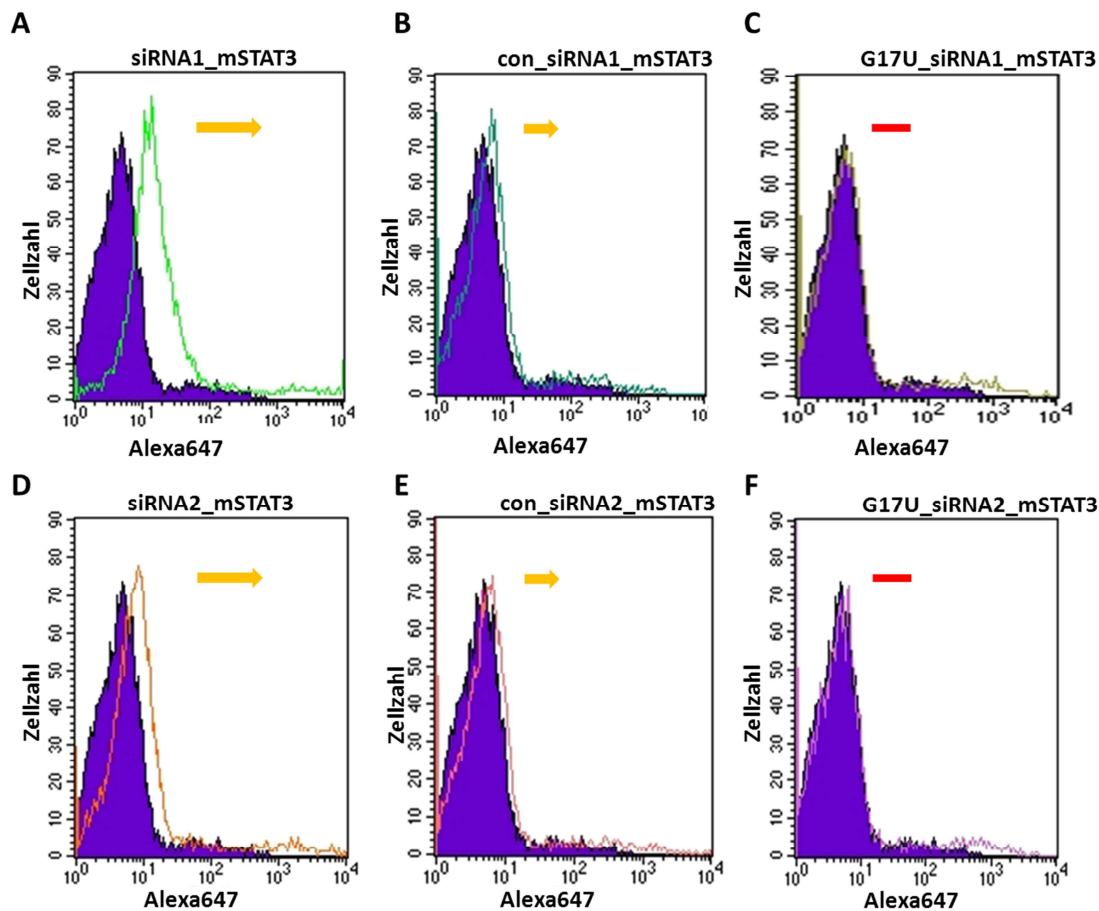


Abbildung 5-46: Nachweis der Bindung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3 an den membranständigen IL-6R mittels Durchflusszytometer.

Mittels Durchflusszytometrie wurden BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen auf ihre Autofluoreszenz im roten Kanal untersucht (blaues Integral, ). Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647[®] markierten Aptamer-siRNA-Chimären wurden mit einer Endkonzentration von 3-6 nM mit den Zellen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Dabei zeigte sich bei den Chimären siRNA1/2_mSTAT3 (**A**, /**D**, ) ein deutlicher *Shift* zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Bei den Kontroll-Chimären mit der *scrambled*-siRNA Sequenz con_siRNA1/2_mSTAT3 (**B**, /**E**, ) konnte nur eine geringer *Shift* beobachtet werden. Die Chimären, welche die Punktvariante des Aptamers G17U enthielten, G17U_siRNA1_mSTAT3 (**C**, ) bzw. G17U_siRNA2_mSTAT3 (**F**, ), zeigten keine Verschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten.

Diese Experimente verdeutlichten, dass die Chimären aus dem Aptamer 16-3A und siRNA-Sequenzen für murines STAT3 auch an den nativen IL-6R binden konnten (Abbildung 5-46). Die Interaktion zwischen der RNA bestehend aus dem Aptamer und einer siRNA-Sequenz gegen mSTAT3 führte zu einem deutlichen *Shift* (Abbildung 5-46 A/D), und auch die kovalente Verbindung des Aptamers 16-3A mit der *scrambled* Version der jeweiligen siRNAs (B/E) führte zu einer messbaren Verschiebung der Fluoreszenzintensität. Enthielten die Chimären hingegen nicht das Ausgangsaptamer 16-3A, sondern die Punktvariante 16-3A_G17U (C/F), blieb die Fluoreszenzintensität auf dem Level der Autofluoreszenz.

5.10.6. Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären durch rekombinanten humanen Dicer

Nachdem die spezifische Wechselwirkung zwischen den Aptamer-siRNA-Chimären und dem löslichen und membrangebundenen IL-6R sicher gestellt wurde, sollte geklärt werden inwiefern die Aptamer-siRNA-Chimären in charakteristische siRNA-Fragmente durch das Enzym Dicer prozessiert werden können. Nur durch eine korrekte Prozessierung der Chimären wäre eine Runterregulierung der Zielgene mSTAT3/5 möglich. Um dies zu analysieren wurden die Chimären mit dem radioaktiven Isotop γ - ^{32}P -ATP am 5'-Ende markiert (4.2.6). Zur Abtrennung des nicht eingebauten Isotops wurden die Fragmente über präparative PAGE gereinigt und auf einem 10%-igen PAA-Gel überprüft (5.10.3). Jeweils gleiche Mengen der Chimären wurden mit oder ohne dem rekombinanten Enzym hDicer (4.5.4) inkubiert und die Proben auf einem 15%-igem denaturierenden PAA-Gel analysiert. Diese wurden getrocknet und die Produkte mittels Autoradiographie (4.1.5) visualisiert. Gezeigt ist ein Gel des Versuches für murines STAT3 der Zielsequenz 2 auf mRNA-Ebene. (Abbildung 5-47).

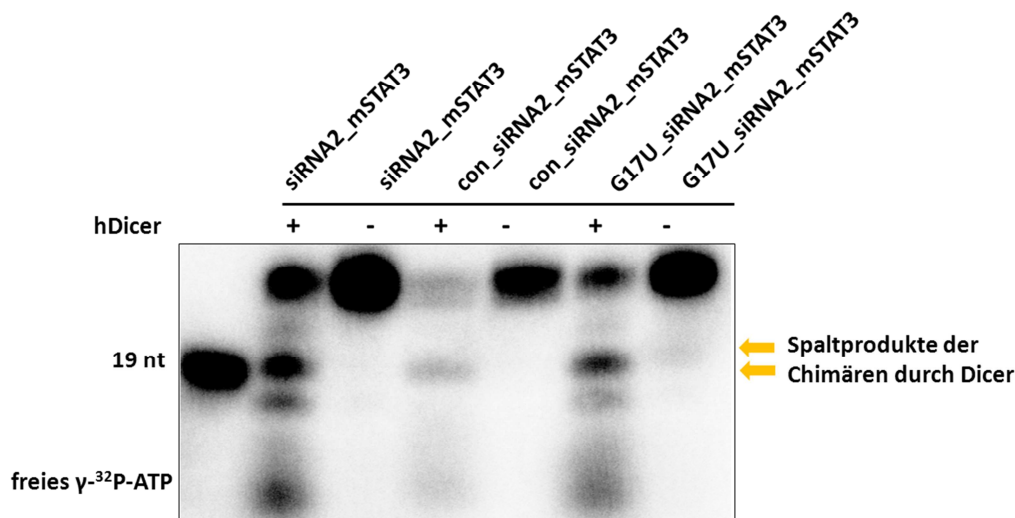


Abbildung 5-47: Analyse der Prozessierung der Aptamer-siRNA-Chimären für murines STAT3 durch hDicer.

Die radioaktiv-markierten Chimären für mSTAT3 wurden mit bzw. ohne den Zusatz von rekombinantem humanem Dicer inkubiert und die Proben anschließend auf einem 15%-igem denat. PAA-Gel getrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Dabei konnte bei allen untersuchten Chimären neben dem Ausgangsprodukt (71 nt) ein spezifisches Spaltprodukt auf der Höhe von ~ 19 nt beobachtet werden, wenn dem Ansatz das Enzym zugesetzt war.

Wurden die Aptamer-siRNA-Chimären mit humanem Dicer inkubiert, konnten für alle Aptamer-siRNA-Chimären Spaltprodukte nachgewiesen werden, die einer Größe von ~ 19 nt entsprachen. Humaner Dicer prozessiert dsRNA in Fragmente einer typischen Länge von 19-22 nt. Fehlte das Enzym im Ansatz, entstanden diese Spaltprodukte nicht und es wurden lediglich die Aptamer-siRNA-Chimären (71 nt) detektiert. Zusätzlich zu Fragmenten auf der

erwarteten Höhe wurde am unteren Ende des Gels das freie Isotop, sowie auf Höhe von ~15 nt eine weitere Bande sichtbar, welches auf die nicht 100%-ig spezifische Spaltung von hDicer zurückzuführen sein könnte. Für die siRNA-Aptamer-Chimären für murines STAT5 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

5.10.7. Analyse der Herabregulation von pSTAT3 nach Transfektion von BAF/3-Zellen mit den Aptamer-siRNA-Chimären

Um die Funktionalität der konstruierten Aptamer-siRNA-Chimären zu analysieren, wurde die Zelllinie BAF_gp130_hIL-6R mit allen konstruierten Chimären für mSTAT3 und mSTAT5 transfiziert. Sollten die siRNA-Komponenten der Chimären aktiv sein, ließe sich eine mögliche Herunterregulation von murinem STAT3/5 mittels Western Blot nachweisen.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine kommerziell erworbene siRNA-Probe gegen murines STAT3 (3.9) verwendet (anti-pSTAT3-siRNA), um optimale Bedingungen bezüglich der verwendeten siRNA-Konzentration zu erhalten sowie den Zeitpunkt der Zellernte nach erfolgter Transfektion zu bestimmen (4.4.6). Diese kommerziell erworbene Probe beinhaltete eine Kombination zweier siRNAs mit unterschiedlichen Zielsequenzen. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen der kommerziellen siRNA-Probe (3, 30 und 300 nM) verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe der Nucleofactor® Technologie (3.6) transfiziert und nach 6, 24 und 48 h post Transfektion geerntet. Die Produktion von phosphoryliertem mSTAT3 wurde mittels Western-Blot analysiert (3.7). Als Kontrollen wurden Zellen ohne RNA oder mit einer Kontroll-RNA (anti-human-gapdh_Atto647N) behandelt. (Abbildung 5-48 A). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein GFP kodiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 5-48 B).

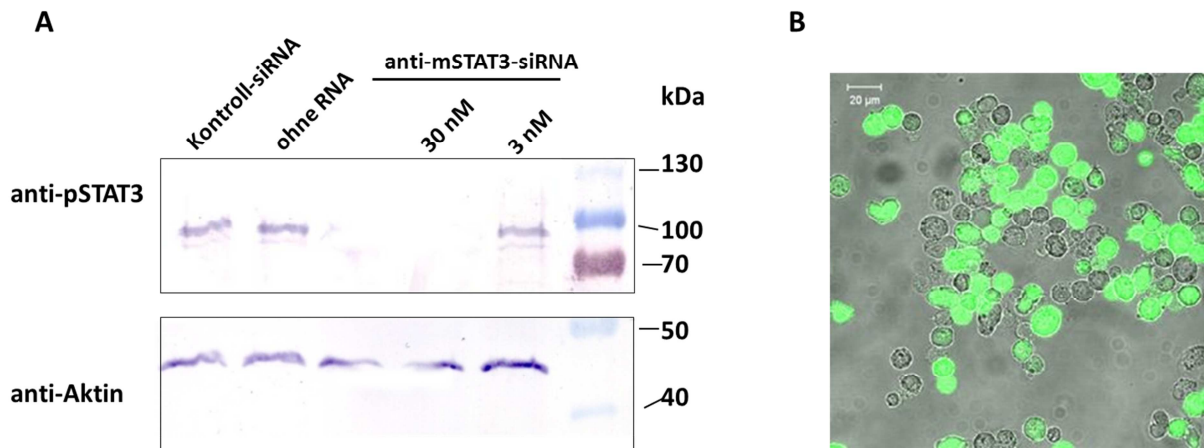


Abbildung 5-48: Optimierung der Transfektion von BAF/3_gp130_hIL6R Zellen mit einer anti-mSTAT3-siRNA und Bestimmung der Transfektionseffizienz.

(A) BAF/3-Zellen, welche den nativen hIL-6R exprimieren, wurden nach mehrfachem Waschen ÜN mit IL-3 inkubiert und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen einer siRNA gegen murines STAT3 mittels der Nucleofactor™ Technologie transfiziert. Dem Zellkulturmedium war sowohl IL-3 als auch IL-6 zugesetzt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Produktion von phosphoryliertem mSTAT3 mittels Western-Blot analysiert. Dabei wurden ein anti-pSTAT3 und ein anti-Aktin-Antikörper verwendet. **(B)** Transfektion von BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen mit dem Plasmid pmaxGFP™ (2 µg). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Bestimmung der Transfektionseffizienz 24 h nach Transfektion (488 nm).

Unbehandelte BAF/3-Zellen zeigten 48 h nach erfolgter Transfektion im Western Blot eine deutliche Proteinbande bei einer Größe von etwa 90 kDa, was dem Molekulargewicht von pSTAT3 entspricht (Abbildung 5-48 A, Spur 2). Der Einsatz einer Kontroll-RNA änderte dies nicht (Spur 1). Eine deutliche Abschwächung der pSTAT3-entsprechenden Proteinbande konnte für die anti-pSTAT3-siRNA nachgewiesen werden. Ab einer siRNA-Konzentration von 30 nM im Ansatz konnte kein pSTAT3 mehr detektiert werden. (Spur 3 und 4). Um die Transfektionseffizienz zu ermitteln, wurden 24 h nach Transfektion Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen aufgenommen, welche mit dem Plasmid pmaxGFP™ transfiziert wurden. Mehr als 60% der Zellen zeigten eine grüne Fluoreszenz, was wiederum auf eine GFP-Expression und somit erfolgreiche Transfektion hinwies. Wurden BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen 6 bzw. 24 h nach der Transfektion mit der anti-pSTAT3-siRNA geerntet und mittels Western-Blot analysiert, zeigte sich kein eindeutiger Effekt in der Produktion von pSTAT3 (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Herunterregulation von murinem pSTAT3 determiniert werden konnten, wurden BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen mit einer Konzentration von 200 nM der Chimären transfiziert und 48 h post Transfektion geerntet. Die Produktion der murinen Transkriptionsfaktoren pSTAT3 bzw. pSTAT5 wurde mittels Western-Blot analysiert.

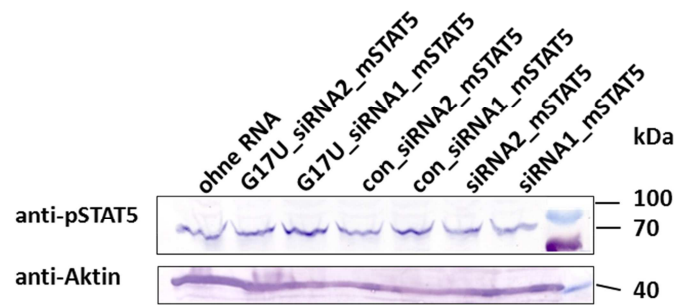


Abbildung 5-49: Analyse der Produktion von mSTAT5 nach Transfektion von hIL-6R tragenden BAF/3 Zellen mit den Aptamer-siRNA-Chimäre mittels Western-Blot.

BAF/3_gp130_hIL-6R Zellen (6×10^5) wurden mit je 200 nM der Chimären aus Aptamer und siRNAs für mSTAT5 transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen in 100 μ l 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proben (20 μ l) über ein SDS-PAA-Gel (10%) getrennt. Die Expression von phosphoryliertem mSTAT5 wurde unter Verwendung eines anti-murin-pSTAT5-Ak mittels Western-Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde weiterhin ein anti-Aktin-Antikörper eingesetzt.

Wie anhand von Abbildung 5-49 ersichtlich, konnte in allen Proben eine Bande vergleichbarer Intensität auf Höhe von etwa 90 kDa detektiert werden. Da IL-3 dem Zellkulturmedium während der 48-stündigen Inkubation zugesetzt war, sollte eine konstitutive Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors mSTAT5 vorliegen. Somit wurde davon ausgegangen, dass die Produktion des phosphorylierten Transkriptionsfaktors mSTAT5 in allen Proben auf einem vergleichbaren Level war. Auch die Analyse der Expression von phosphoryliertem mSTAT3 lieferte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Somit musste davon ausgegangen werden, dass die produzierten Chimären aus Aptamer und siRNA nicht in der Lage waren, die Produktion der Zielproteine mSTAT3/5 herunter zu regulieren. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die Produktion von phosphoryliertem mSTAT3 nach der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Chimären mittels Western-Blot analysiert.

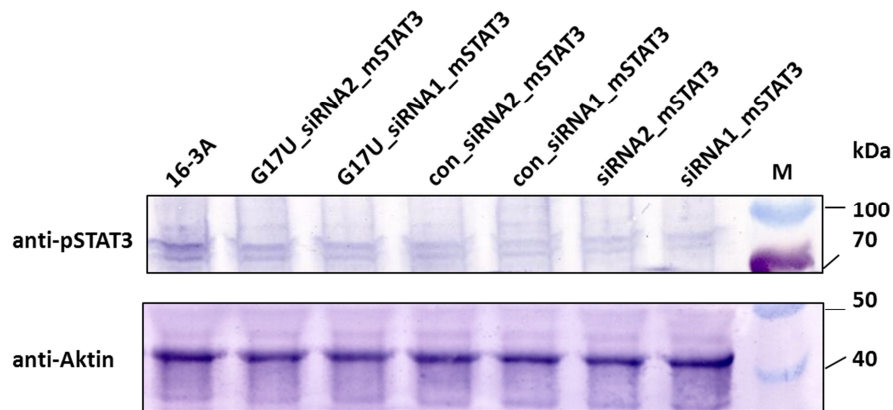


Abbildung 5-50: Analyse der Expression von phosphoryliertem mSTAT3 in hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen nach Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3.

Je 2×10^5 BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen wurden mit den Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3 (120 nM) in Selektionspuffer bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium mit IL-6 (10 ng/mL) transferiert und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Folgend wurden die Proben in 100 μ L 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine (20 μ L Probe) über ein SDS-PAA-Gel (10%) getrennt. Die Expression von phosphoryliertem mSTAT3 wurde unter Verwendung eines anti-murin-pSTAT3-Ak mittels Western-Blot untersucht. Als Ladekontrolle wurde weiterhin ein anti-Aktin-Ak eingesetzt.

Auch nach der Rezeptor-vermittelten Internalisierung der Chimären aus dem Aptamer 16-3A und Sequenzen für siRNAs mit Ziel mSTAT3 konnte im Western-Blot keine Verringerung der Bandenintensitäten detektiert werden (Abbildung 5-50). Dabei konnte zwischen der α -Form (91 kDa) und der β -Form (86 kDa) von pSTAT3 unterschieden werden. Somit verblieb die Produktion des phosphorylierten Transkriptionsfaktors mSTAT3 in allen Proben auf dem gleichen Niveau. Die Annahme, dass die produzierten Chimären aus Aptamer und siRNAs mit Spezifität für mSTAT3 nicht in der Lage waren, die Produktion von mSTAT3 herunter zu regulieren, konnte somit bestätigt werden. Da durch den Zusatz von IL-6 im Zellkulturmedium die stetige Phosphorylierung von STAT3 gesichert war, konnte davon ausgegangen werden, dass kein Unterschied im Gehalt von mSTAT3 zu phosphoryliertem mSTAT3 bestand.

6. Diskussion

Aptamer sind kurze Nukleinsäuren (DNA oder RNA), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Faltung spezifisch und mit hoher Affinität Zielstrukturen binden können [35]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Publikationen über Aptamere mit Spezifität für Transmembranproteine veröffentlicht [78]. Einige Aptamere besitzen das Potential, Rezeptor-vermittelt verschiedenste Substanzklassen ins Zellinnere zu transportieren. Dabei reichte das Spektrum der eingeschleusten Stoffe von niedermolekularen Verbindungen über Proteine bis hin zu relativ großen Aptamer-Nanopartikel-Komplexen. Auch Nukleinsäure-Chimären aus Aptameren und siRNAs wurden über Rezeptor-vermittelte Endozytose Zelltyp-spezifisch internalisiert. Aufgrund dieser Fähigkeit der Zell-spezifischen Einschleusung gelten Aptamere als vielversprechende molekulare Werkzeuge. In mehreren Studien konnten diese Chimären aus Aptamer und siRNAs dazu genutzt werden, gezielt Tumor-spezifische Gene in Karzinomzellen auszuschalten bzw. anti-Tumor-Medikamente zu internalisieren. In *in vivo* Studien konnte bereits bei systemischer Verabreichung definierter Chimären eine Rückbildung von Krebszellen im Xenograft-Modell gezeigt werden [93, 114, 115].

Ein Aptamer, welches möglicherweise als solch ein molekulares Werkzeug genutzt werden kann, ist das Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamer 16-3A. Bei diesem RNA-Aptamer handelt es sich um das minimierte Binde-Motiv des ursprünglich selektierten Aptamers 16-3 (106 nt), welches aus nur noch 19 Nukleotiden besteht. Es bindet den extrazellulären, löslichen Teil des humanen IL-6-Rezeptors (sIL-6R) [6]. Dieser spielt, wie auch das Zytokin IL-6, eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern, wie beispielsweise Rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, Blutkrebs, Prostatakrebs, Multiple Sklerose, Diabetes und Arteriosklerose [32]. Eine wünschenswerte therapeutische Anwendung des Aptamers wäre, dieses als Zell-spezifisches *Delivery*-Reagenz nutzen zu können. Da der IL-6-Rezeptor ständigen Recycling-Prozessen unterliegt sollte diese Option gegeben sein, falls das gebundene Aptamer internalisiert würde [4, 29].

Das Ziel dieser Arbeit lag nun in der Charakterisierung des IL-6R-spezifischen RNA-Aptamers 16-3A. Es sollte untersucht werden, ob sich das Aptamer dazu eignet, Substanzen in Zellen einzuschleusen und welche Auswirkungen die Aptamer-Bindung an den nativen IL-6R hat.

6.1. Charakterisierung des RNA-Aptamers 16-3A und angewandte Mutationsanalysen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war das 19 nt-lange RNA-Aptamer 16-3A, welches hoch affin und hoch spezifisch den IL-6-Rezeptor bindet. In der Sequenz des Aptamers 16-3A (GGG GAG GCU GUG GUG AGG G) ist das gehäufte Vorkommen von Guaninresten auffällig, weshalb vermutet wurde, dass das Aptamer als strukturstabilisierendes Motiv einen G-Quadruplex ausbildet. Analysen, in denen Guanine gegen Uridine ausgetauscht wurden, untermauerten diese Annahme, und die mögliche Struktur des G-Quadruplexes wurde postuliert [6]. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der G-Quadruplex eine parallele Ausrichtung annimmt und sich aus zwei G-Quartetten zusammensetzt (Abbildung 1-14). Die Ausbildung von G-Quadruplexen mit nur zwei übereinander gestapelten G-Quartetten ist nicht sehr verbreitet, da die Stabilität von G-Quadruplexen mit der Anzahl an G-Quartetten korreliert [60]. Als ein Beispiel kann hier das Thrombin-bindende Aptamer genannt werden [143]. Die Struktur und Topologie eines G-Quadruplexes lässt sich anhand von CD-Messungen nachweisen. Ausgehend von spezifischen Spektren lassen sich unterschiedliche Konformationen, wie die parallele oder antiparallele Anordnung der Stränge, zuweisen [63]. Die Ausbildung eines G-Quadruplexes mit paralleler Konformation konnte für das Aptamer 16-3A nachgewiesen werden [5]. Ausgehend von dieser Struktur würden drei Loopregionen resultieren, welche vermutlich maßgeblich für die Spezifität der Bindung an das Target verantwortlich sind. Mit Hilfe von Mutationsanalysen, in denen einzelne Basen in den Loopregionen verändert wurden, sollte der Einfluss des jeweiligen Nukleotids auf die Bindung untersucht werden. Dabei wurden größtenteils Purine durch Pyrimidine (bzw. umgekehrt) ersetzt: G→U, A→U, C→A und U→A. Lediglich die Guaninreste an Position 4 und 10 (G4 und G10) wurden nicht gegen Uracil, sondern gegen Adenin ausgetauscht. Für die Untersuchung dieser Varianten des Aptamers war es notwendig, diese mittels *in vitro* Transkription zu produzieren. Die DNA-abhängige T7-RNA-Polymerase bindet spezifisch an eine doppelsträngige Promotorsequenz. Eine effektive Transkription findet statt, wenn die Transkription der RNA mit der Basenabfolge GG beginnt [144]. Diese Voraussetzung war durch das Aptamer 16-3A gegeben. Für die Transkription der Varianten wurde deren *reverse*-komplementäre Sequenz am 3'-Ende um die *reverse*-komplementäre Sequenz des T7-Promotors ergänzt. Um im Bereich des Promotors ein doppelsträngiges DNA-Templat zu generieren, wurde ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid mit der T7-Promotorsequenz mit

den für die Mutanten kodierenden Sequenzen hybridisiert (Abbildung 5-1). Um die Aptamere transkribieren zu können, benötigt die T7-RNA-Polymerase lediglich die Promotorregion als doppelsträngigen Bereich. Den DNA-Strang mit Hilfe des Klenow-Fragmentes aufzufüllen war aus diesem Grunde nicht zwingend notwendig [144]. Die Hybridisierungsansätze konnten somit unmittelbar für eine *in vitro* T7-Transkription eingesetzt werden. Mittels T7-Transkription und präparativer PAGE unter denaturierenden Bedingungen konnten alle zu untersuchenden Punktvarianten des Aptamers erfolgreich produziert und gereinigt werden. Eine singuläre Bande in den entsprechenden Kontrollgelen führte zu dieser Aussage (Abbildung 5-3). Als Standard wurde ein microRNA-Marker sowie das chemisch synthetisierte Aptamer 16-3A eingesetzt. Somit konnte die korrekte Größe der transkribierten Produkte sichergestellt werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass das Laufverhalten kurzer Nukleinsäuren auch in denaturierenden PAA-Gelen von der Basenzusammensetzung abhängig ist [145].

Für die Analyse der Affinität des Aptamers 16-3A und davon abgeleiteter Varianten zum IL-6R wurde nicht der lösliche IL-6R eingesetzt, welcher für die SELEX verwendet wurde, sondern das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 [129]. Dieses konnte in höheren Ausbeuten produziert werden und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Bindung des Aptamers 16-3A zum Protein HIL-6 konnte bereits mittels radioaktiver Filterbindungsstudien gezeigt werden [6]. Allerdings war eine quantitative Aussage über die Bindungskonstante noch nicht gegeben. In ersten Experimenten (Daten nicht gezeigt) zeigte sich, dass eine Transkription mit radioaktiven α - ^{32}P -GTP nicht zu einer ausreichenden Ausbeute des kurzen Aptamers 16-3A führte. Diese Methode wurde zuvor standardmäßig für die Produktion von radioaktiven RNAs für Filterbindungsstudien eingesetzt. Für die Transkription von kleinen Ribonukleinsäuren erwies sich dies jedoch als nicht optimal. Stattdessen wurde eine radioaktive Endmarkierung unter Verwendung von γ - ^{32}P -ATP durchgeführt. Hierfür wurden die zu analysierenden Proben zunächst unter nicht radioaktiven Bedingungen produziert und gereinigt. Um die Proben mit dem Isotop ^{32}P am 5'-Ende zu markieren, musste zunächst die endständige 5'-Triphosphatgruppe entfernt werden. Zur Aufbereitung der Proben folgten eine Extraktion mit Phenol-Chloroform und eine Alkoholpräzipitation. Erst im Anschluss konnte die radioaktive Markierung der Proben erfolgen (Abbildung 5-4). Diese Prozedur war um viele Schritte aufwendiger und damit zeitintensiver als die radioaktive Markierung

während der Transkription. Die Ausbeute der markierten Proben und die Qualität der erhaltenen Filterbindungsstudien rechtfertigten dieses Vorgehen. Diese Schlussfolgerung wurde durch die quantitative Bestimmung der Radioaktivität mittels Flüssigkeits-szintillationszähler, analytischer PAGE und der Qualität der Filterbindungsstudien gezogen. Eine quantitative Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und der Markierungseffizienz wurde allerdings nicht durchgeführt.

Um gesicherte Daten über die Bindungskonstanten des Aptamers 16-3A zu erhalten, wurden zahlreiche Filterbindungsstudien durchgeführt. Weiterhin wurde das Aptamer in jeder durchgeführten Filterbindungsstudie dieser Arbeit als Positivkontrolle und Referenz eingesetzt (Abbildung 5-5). Somit konnte aus zwölf Bestimmungen ein K_d -Wert (Dissoziationskonstante) von $66,6 \pm 21,7$ nM für das Aptamer 16-3A ermittelt werden (Tabelle 5-2). Diese Affinität im nanomolaren Bereich verdeutlicht die starke Wechselwirkung zwischen dem kurzen Aptamer und Hyper-IL-6. So wurden auch für andere Aptamere mit Spezifität für Rezeptoren und Membranproteine ähnliche K_d -Werte beschrieben. Als Beispiele seien hier das PSMA-spezifische RNA-Aptamer A9 (K_d -Wert $\sim 2,1$ nM) [108], das EGFR-spezifische RNA-Aptamer J18 (K_d -Wert ~ 7 nM) [122] und das MUC1 bindende DNA-Aptamer 5TR1 (K_d -Wert ~ 21 nM) genannt. Eine Zell-SELEX von DNA-Aptameren spezifisch für IL-17RA führte zu einem angereicherten Pool nach zwölf Selektionsrunden mit einem K_d -Wert von ~ 33 nM [146]. Für die Bestimmung von Affinitäten können unterschiedliche Messmethoden, wie Durchflusszytometrie, Filterbindungsstudien, SPR oder Gel-*Shift*-Assays angewendet werden, die unter Umständen zu Abweichungen führen können. Verglichen mit den verlängerten Versionen des Aptamers 16-3 (106 nt; K_d -Wert $\sim 19,7 \pm 4,2$ nM) und 16-3B (47 nt; K_d -Wert $\sim 26,4 \pm 7,1$ nM) [6] weist das sehr verkürzte Aptamer 16-3A (19 nt) einen ähnlichen K_d -Wert auf. Der Anteil der maximalen Bindung lag mit $\sim 30\%$ (16-3A) gegenüber den längeren Varianten 16-3 (48%) und 16-3B (43%) [6] etwas niedriger, aber in einem vergleichbaren Bereich. Die Werte der 47 nt bzw. 106 nt langen Aptamere wurden ebenfalls über analytische Filterbindungsstudien ermittelt. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass das Aptamer 16-3A nicht, wie 16-3 und 16-3B, über eine radioaktive T7-Transkription produziert wurde. Weiterhin konnte nicht dieselbe Proteincharge an HIL-6 verwendet werden. Diese beiden Faktoren könnten zu Abweichungen beigetragen haben.

In Filterbindungsstudien wurde der Einfluss der einzelnen Nukleotide in den Loopregionen auf die Bindung zu HIL-6 analysiert. Dabei zeigte sich, dass von den elf untersuchten Varianten vier ihre Affinität zur Zielstruktur vollständig eingebüßt hatten (Tabelle 5-2). Dabei wurde ausschließlich Guanin durch anderen Basen ersetzt: G4A, G10A, G15U und G17U. Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese Guaninreste direkt an der Wechselwirkung zum Zielprotein, an der Ausbildung des G-Guadruplexes oder an beiden Optionen beteiligt sind. Bemerkenswert ist, dass der Austausch des Purins Guanin zum Purin Adenin an Position 4 bzw. 10 zum vollständigen Verlust der Bindung führte. Die beiden Purine unterscheiden sich lediglich durch die Aminogruppen am C2- und C6-Atom. Hier könnten Wasserstoffbrückenbindungen zum Zielmolekül eine wichtige Rolle spielen. Eine deutliche Reduktion der Bindung trat in der Variante 16-3A_U9A auf. Der Austausch des Pyrimidins Uracil zum Purin Adenin hatte einen Anstieg des K_d -Wertes um das Fünffache zur Folge. Somit spielt auch dieser Rest für die Bindung eine entscheidende Rolle.

Die Wechselwirkungen zwischen Aptameren und ihren Zielmolekülen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen, Stapelkräften und elektrostatischen Wechselwirkungen hervorgerufen. Weiterhin sind eine exakte Passgenauigkeit für die hohe Spezifität und Affinität wichtig [147]. Der Austausch von Guaninen gegen Adenine beeinflusst alle der genannten Wechselwirkungen. Purine sind im Gegensatz zu Pyrimidinen heterocyclische aromatische Verbindungen aus zwei Ringsystemen und nehmen mehr Raum ein. Dies kann die Passgenauigkeit und die Fähigkeit, die richtigen Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, beeinflussen. Für die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen sind die geometrische Ausrichtung des Donators und Akzeptors sowie deren Abstand zueinander entscheidend. Auch elektrostatische Wechselwirkungen üben ihren Einfluss nur in einem bestimmten Radius aus, und die Stärke der Coulomb'schen Kraft richtet sich nach dem Abstand zwischen den beteiligten Ionen. Basenstapelkräfte werden als Dipoleffekt zwischen partiell positiv geladenen exocyclischen Gruppen der Basen mit den π -Elektronenwolken der vertikal benachbarten Basen verstanden. Dabei spielt die quasi-aromatische Struktur der Heterocyclen der Basen eine wesentliche Rolle. Während Adenin, Guanin und Cytosin jeweils eine exocyclische Amino-Gruppe besitzen, fehlt diese bei Uracil. Aus diesem Grund fallen Stapelkräfte von Uracil bzw. Uridin deutlich geringer aus.

Zur Evaluierung der Ergebnisse der Mutationsanalysen wurden die Interaktionen der zu analysierenden Nukleinsäuren an Hyper-IL-6 neben Filterbindungsstudien auch mittels

Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) untersucht. Mit Hilfe der SPR können die Interaktionen nicht-markierter Moleküle analysiert und Informationen über die Kinetik von Wechselwirkungen erhalten werden [148]. Hierfür wurden auf der Oberfläche eines Sensor-Chips die Proteine HIL-6 und IL-6 immobilisiert und unterschiedliche Konzentrationen des Aptamers in das Flusssystem injiziert. Das Signal von Sensor 1 (IL-6) wurde vom Signal an Sensor 2 (HIL-6) subtrahiert, um ausschließlich die spezifische Bindung an HIL-6 zu messen. Zunächst konnten die Parameter der Bindung, wie der K_d -Wert und die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) bzw. Dissoziation (k_d), für das Aptamer 16-3A bestimmt werden (Tabelle 5-3). Dabei wurden sowohl das chemisch synthetisierte, als auch das enzymatisch hergestellte Aptamer vermessen. Dabei zeigte sich, dass das kommerziell erworbene Aptamer eine um eine Größenordnung bessere Assoziation als das über T7-Transkription produzierte Aptamer aufwies, die Dissoziation aber nahezu gleich blieb (Tabelle 5-3). Dies führte zu einem K_d -Wert im einstelligen nanomolaren Bereich für das chemisch synthetisierte Aptamer. Die ermittelten Dissoziationskonstanten von ~ 9 nM (chemisch synthetisiert) bzw. 135 nM (enzymatisch produziert) waren im Einklang mit den mittels Filterbindungsstudien erhaltenen Werten von ~ 67 nM. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass für die Bestimmung des enzymatisch hergestellten Aptamers lediglich vier Konzentrationen anstatt sechs (chemisch) eingesetzt wurden. Dies könnte die Genauigkeit des *Fits* nach einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell beeinflusst haben. Weiterhin wurde während der Messungen deutlich, dass geringe Unterschiede in der Pufferzusammensetzung (Laufpuffer und Aptamerlösung) zu Ausschlägen des detektierten Signals (*Peaks*) führen können. Beim Start bzw. Stopp der Injektion wurde z. T. ein Indexsprung der RU-Werte (*bulk-shift*) beobachtet. Aus diesem Grund war es zwingend erforderlich, unmittelbar vor der Messung die Aptamerlösung herzustellen. Hierfür wurde der gleiche Selektionspuffer genutzt, der auch als Laufpuffer diente.

Da das enzymatisch produzierte Aptamer einer präparativen PAGE unterzogen wurde, war nicht auszuschließen, dass geringe Gelreste und Salze in der Aptamerlösung verblieben waren. Dies könnte zu Störungen zwischen der Interaktion des Aptamers und dem Zielprotein HIL-6 geführt haben. Ebenso hätten Gelreste, Salze und Spuren von Glykogen zu einem geringfügigen Unterschied in der Pufferzusammensetzung und zu einem abweichenden pH-Wert führen können. Leichte Unterschiede dieser Parameter hätten die Qualität bzw. die Messung insgesamt beeinflussen können was von der Sensitivität dieser

Messmethode zeugt. Außerdem sei vermerkt, dass die Zugabe von 0,01% Tween20 (v/v) im Selektionspuffer essentiell war, um das Entstehen von Luftblasen im System zu verhindern. Ein Vergleich mit den vorliegenden kinetischen Daten des ursprünglich selektierten Aptamers 16-3 (106 nt) [149] zeigt, dass die Bindung des verkürzten Aptamers 16-3A (19 nt) sehr ähnlich verläuft. So unterscheiden sich die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation $k_a \sim 6,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (16-3A) zu $k_a \sim 1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (16-3), sowie der Dissoziation $k_d \sim 5,4 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$ (16-3A) zu $2,0 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$ (16-3) nur in geringem Maße. Es wurde davon ausgegangen, dass es in der längeren Variante des Aptamers Regionen gibt, die für die Bindung nicht verantwortlich sind. Die Länge des Aptamers spielt somit nur eine untergeordnete Rolle im Bindungsverhalten. Die Verkürzung des Aptamers führt nicht zwangsläufig zu einer schnelleren Dissoziation vom Zielprotein. Dies wurde z. B. für das DNA-Aptamer gegen Daunomycin beobachtet. Hier resultierte die Reduzierung des Aptamers von 80 auf 40 Nukleotide zu einer 10-fach beschleunigten Dissoziation [150].

Sowohl das Aptamer 16-3 als auch die verkürzte Variante 16-3A weisen eine langsame Dissoziation auf. Die Geschwindigkeit der Dissoziation lag im Bereich von 10^{-4} s^{-1} . Im Vergleich zu einem DNA-Aptamer, welches ebenfalls für den sIL-6R selektiert wurde, ist dies um den Faktor 100 langsamer [139]. In anderen Studien wurden vergleichbare Daten über die kinetischen Parameter der Bindung zwischen Aptameren und ihren Zielmolekülen erhalten. So wurde in SPR-Analysen die Wechselwirkung zwischen 2'-F-modifizierten RNA-Aptameren und humanem IgG untersucht. Dabei lagen die Geschwindigkeitskonstanten für die erste Bindungsstelle des Antikörpers bei $k_a \sim 3-8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation k_d wurden Werte zwischen $3-30 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$ gemessen [151].

Mittels SPR wurde eine Dissoziationskonstante von 1,7 nM für das Aptamer 16-3 bestimmt, welche um den Faktor 10 niedriger liegt, als der über Filterbindungsstudien erhaltene Wert [6]. Ebenso konnte dies für das in dieser Arbeit untersuchte Aptamer 16-3A beobachtet werden. Auch hier liegt der mittels SPR gemessene K_d -Wert von 8,5 nM unter dem mittels Filterbindungsstudien ermittelten (66,7 nM).

Um den Einfluss von einzelnen Basen an der Wechselwirkung zwischen Aptamer und dem Zielprotein Hyper-IL-6 zu untersuchen, wurden Punktvarianten hergestellt. Dabei wurden alle Nukleotide in den Loopregionen des G-Quadruplexes einzeln ausgetauscht (Tabelle 5-1). Neben Filterbindungsstudien sollte die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie als

weitere Messmethode angewandt werden. Da sich die enzymatische Produktion und Aufbereitung der Proben als sehr zeitintensiv herausstellte, wurde auf eine konzentrationsabhängige Bindungsstudie verzichtet. Weiterhin erwies sich die Elution von gebundenem Aptamer als schwierig. Mehrere Injektionen mit einer Salzsäurelösung (100 mM) waren hierfür erforderlich, was sich negativ auf die auf der Chip-Oberfläche fixierten Proteine HIL-6 und IL-6 auswirkte. So wurden die elf verschiedenen Punktvarianten mit jeweils nur einer Konzentration vermessen. Diese lag bei 1 μ M und konnte Aufschluss über die generelle Fähigkeit zur Bindung geben. So konnten mittels SPR die über Filterbindungsstudien gewonnenen Erkenntnisse nahezu vollständig bestätigt werden (Tabelle 5-4). Auch in den Messungen der Oberflächenplasmonresonanz zeigte sich, dass ein Austausch der Guaninreste an den Positionen G4, G10, G15 und G17 zum vollständigen Verlust der Bindung führte (Abbildung 5-14).

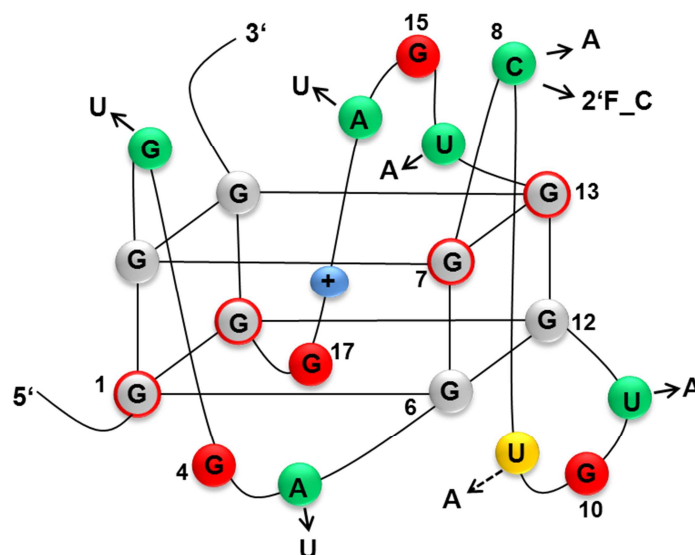


Abbildung 6-1: Postulierte G-Quadruplex-Struktur des Aptamers 16-3A und Auswirkungen einzelner Basenaustausche auf die Bindung des Aptamers zu HIL-6.

Schematische Darstellung des Aptamers 16-3A, welches die mögliche Struktur eines parallelen G-Quadruplexes annimmt. Mittels Filterbindungsstudien und SPR-Messungen wurde der Einfluss einzelner Basen auf die Affinität des Aptamers zu HIL-6 analysiert. Guaninbasen, welche putativ an der Formation des Quadruplexes teilnehmen, sind grau markiert. Grün hinterlegte Basen konnten in Mutationsanalysen durch andere Basen ersetzt werden, ohne dass ein Affinitätsverlust zu HIL-6 beobachtet wurde. Der Austausch der entsprechenden Basen zu einer anderen ist durch einen Pfeil markiert. Lediglich in Filterbindungsstudien führte der Austausch von Uracil zu Adenosin an Position 9 nicht zu einem vollständigen Verlust der Bindung, welcher in SPR-Messungen beobachtet wurde. Ein Austausch rot hinterlegter Guaninbasen führte zu einem Verlust der Bindung. Rot umrandete Guaninbasen sind für die Bindung des Aptamers zu HIL-6 ebenfalls essentiell und wurden in vorherigen Studien analysiert [6]. Zentral gelegen ist ein monovalentes Kation (blau).

Mittels SPR konnte im Gegensatz zu den Filterbindungsstudien keine Bindung der Variante U9A an Hyper-IL-6 detektiert werden. Allerdings betrug der Anteil der maximalen Bindung in Filterbindungsstudien lediglich 10% und der Austausch von Uracil zu Adenin verschlechterte den K_d -Wert um das Fünffache. Eine mögliche Erklärung der Diskrepanz dieser Ergebnisse

könnte in der längeren Zeit der Wechselwirkung zwischen Aptamer und Protein liegen, die bei Filterbindungsstudien gegeben ist. So könnte eine langsame Assoziation während der 30-minütigen Inkubationsdauer bei Filterbindungsstudien weniger ins Gewicht fallen, als bei SPR Messungen, bei denen die Injektion des Aptamers lediglich zwei Minuten andauert.

6.2. 2'-F-Modifikation und Stabilität des Aptamers

Für eine mögliche Anwendung des Aptamers in *in vivo* Studien ist eine verminderte Sensitivität der RNA-Aptamere gegenüber einem nukleolytischen Abbau erstrebenswert. Eine Option, dies zu erreichen, ist die Verwendung von 2'-F-modifizierten Nukleotiden [77]. Da die T7-RNA-Polymerase nur unmodifizierte Nukleotide als Substrate tolerieren kann, kann zur Herstellung von 2'-F-modifizierter RNA die Variante Y639F der T7-RNA-Polymerase verwendet werden [152]. Dieses Enzym ist allerdings nur in der Lage neben den unmodifizierten Nukleosidtriphosphaten modifizierte Nukleotide mit Pyrimidinen zu akzeptieren, weshalb der Einsatz von 2'-F-Adenosin- bzw. 2'-F-Guanosintriphosphat nicht möglich ist. Stattdessen können 2'-F-Cytidintriphosphat bzw. 2'-F-Uridintriphosphat während der *in vitro* Transkription verwendet werden [77]. In der Sequenz des Aptamers 16-3A ist die Base Cytosin nur einmal vertreten. Mittels Filterbindungsstudien und SPR-Messungen konnte eine Beteiligung der Base an den direkten Wechselwirkung zwischen Aptamer und Protein sowie ein direkter Einfluss auf die Struktur bereits ausgeschlossen werden. Somit bestand die Möglichkeit, dass eine post-selektiv eingeführte 2'-F-Modifikation an dieser Position die Affinität zum Zielprotein nicht negativ beeinflusst. Diese Annahme konnte mittels Filterbindungsstudien bestätigt werden. Zwar wies das modifizierte Aptamer 16-3A_2'-F-CTP einen erhöhten K_d -Wert von 235 nM gegenüber dem unmodifizierten Aptamer (67 nM) auf, jedoch blieb die Bindungskonstante im nanomolaren Bereich. Auch der Anteil der maximalen Bindung veränderte sich nicht (Tabelle 5-5).

Die 2'-OH-Gruppe der Ribose spielt eine entscheidende Rolle in der Stabilität von G-Quadruplexen [153]. An dieser Position lagern sich Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen an, die für die Gesamtenthalpie des Strukturmotives mitentscheidend sind. So wurde gezeigt, dass RNA-Quadruplexe eine deutlich höhere Stabilität gegenüber ihren sequenzgleichen DNA-Quadruplexen aufweisen [153]. Auch führte die Substitution der 2'-OH Gruppe der Ribose mit einer Methoxy-Gruppe zu einer veränderten Struktur eines G-Quadruplexes [154]. So überrascht es nicht, dass der Ersatz

von Uridintriphosphaten zu 2'-F-UTP während der T7-Transkription zu einem vollständigen Verlust der Affinität des Aptamers 16-3A_2'-F-UTP zu HIL-6 in Filterbindungsstudien führte (Daten nicht gezeigt). Eine einzige fehlende 2'-OH-Gruppe an Position C8 (16-3A_2'-F-CTP) scheint jedoch nicht für die Gesamtstruktur des G-Quadruplexes entscheidend zu sein.

Mittels radioaktiver Filterbindungsstudien konnten auf schnelle und effiziente Weise Dissoziationskonstanten erhalten werden. Dabei zeigten sich in den durchgeführten Studien neben der spezifischen Bindung an das Ziel-Protein HIL-6 vor allem bei dem Fluor-modifizierten Aptamer 16-3A_2'-F-CTP auch unspezifische Wechselwirkungen mit der Nitrozellulosemembran. Diese unspezifischen Interaktionen konnten durch die Vorbehandlung der Membran mit Aminohexansäure-Puffer zwar gemindert aber nicht ganz verhindert werden. Aus diesem Grund wurde grundsätzlich die Wechselwirkung zwischen der radioaktiv markierten RNA und der Membran detektiert und von den einzelnen Messpunkten subtrahiert. Bei den nicht-modifizierten Aptameren fiel diese unspezifische Interaktion kaum ins Gewicht. Für das Aptamer 16-3A_2'-F-CTP jedoch wäre die Bestimmung der kinetischen Parameter der Bindung mit einer weiteren Messmethode wie *Gel-Shift-Assays* oder SPR sinnvoll. Weiterhin sei vermerkt, dass Schwankungen in den Ergebnissen von K_d -Werten und dem Anteil der maximalen Bindung beobachtet wurden. Dies könnte neben der Beschaffenheit der Membran [155] auch auf eine unterschiedliche Markierungseffizienz zurückzuführen sein.

Das 2'-F-CTP modifizierte Aptamer wies gegenüber dem unmodifiziertem Aptamer 16-3A nur eine geringfügig verbesserte Stabilität in Serum-enthaltenem Medium auf (Abbildung 5-18). Hier konnte eine schwache Bande des radioaktiv markierten Aptamers 16-3A_2'-F-CTP auf Höhe von 19 nt über den gesamten Zeitraum detektiert werden. Das unmodifizierte Aptamer 16-3A war dagegen bereits nach weniger als zwei Minuten teilweise abgebaut. Hier konnte keine Bande auf Höhe des Aptamers (19 nt) detektiert werden (Abbildung 5-17). Auch eine Vorinkubation mit dem Ziel-Protein HIL-6 konnte die nukleolytische Degradation nicht verhindern (Abbildung 5-19). Somit ist zu vermuten, dass die 2'-OH Gruppen der Ribosen des Aptamers nicht in starken Wechselwirkungen mit dem Zielprotein HIL-6 involviert sind, sondern für eine Hydrolysereaktion frei zugänglich sind. Dabei wurden die Aptamere in Serum-enthaltenem Medium nicht vollständig degradiert, sondern stattdessen eine verkürzte Variante auf Höhe von ~ 15 nt detektiert. Da alle Proben am 5'-Ende radioaktiv markiert wurden, ist davon auszugehen, dass ein exonukleolytischer Abbau des

3'-Endes vorlag oder in der Loop-3-Region endonukleolytisch geschnitten wurde [156]. Das Auftreten einer verkürzten RNA nach Inkubation in Serum wurde auch von *Haupenthal et al.* beobachtet [157]. Hier führte eine zweistündige Inkubation von siRNAs in menschlichem Serum zu einer Degradation um einige Nukleotide, aber nicht zum vollständigen Abbau. Die Reaktion konnte durch eine Zugabe von RNase-Inhibitoren verhindert werden. Daher wurde ein Zusammenhang zwischen dem Abbau von siRNAs und dem Vorkommen von RNase A-ähnlichen Enzymen im Serum hergestellt. Auch in Mausserum wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt [158]. Dabei verstärkte sich der Abbau, wenn am 3'-Ende ungepaarte einzelsträngige Bereiche auftraten bzw. vermehrt die Basen Adenin und Uracil in der Sequenz vorkamen. RNase A-ähnliche Enzyme sind ebenso in fötalem Kälberserum vorhanden, welches für die Stabilitätstests in dieser Arbeit verwendet wurde. Nukleinsäuren mit 2'-F-modifizierten Nukleotiden sind gegenüber dem nukleolytischen Abbau durch RNasen weniger sensitiv [35]. Da lediglich eins von neunzehn Nukleotiden an Position 8 (C8) in der Sequenz des Aptamers 16-3A modifiziert wurde, konnte keine effiziente Steigerung der Stabilität erreicht werden. Dass eine Modifikation von Aptameren im Anschluss an eine SELEX erfolgreich durchgeführt werden kann, konnten *Adler et al.* zeigen. Hier führte die Modifikation des Trypanosomen-spezifischen RNA-Aptamers 2-16 (85 nt) [159] mit 2'-F-CTP zu einer Stabilität von über drei Tagen in menschlichem Serum. Auch eine Konjugation mit PEG (10 kDa) führte nicht zu einem signifikantem Affinitätsverlust, konnte aber die pharmakokinetischen Eigenschaften des Aptamers deutlich steigern [160]. Ebenso konnten *Marro et al.* das 34 nt lange RNA-Aptamer C44 durch Einführen eines PEGs (40 kDa) am 5'-Ende und einem invertierten Thymin-Cap am 3'-Ende vor Exonukleasen schützen [161]. Als weiteres Beispiel für die erfolgreiche post-selektive Modifikation eines Aptamers sei das für die Behandlung von AMD zugelassene Pegaptanib bzw. Macugen® genannt [79-81]. Somit besteht durchaus die Möglichkeit, das Aptamer-16-3A durch post-selektive Modifikationen gegenüber dem Abbau durch RNasen zu stabilisieren. Dabei wäre es denkbar, neben einem PEG und einem geschützten 3'-3'dT-Cap nicht für die Bindung relevante Nukleoside durch 2'-F-Cytidin zu ersetzen oder die Sequenz des Aptamers um einige Nukleotide mit 2'-F-Cytidin zu verlängern.

6.3. Bindung des Aptamers an den nativen IL-6R

Zur Beantwortung der Frage, ob das Aptamer 16-3A als Zell-spezifisches *Delivery*-Vehikel verwendet werden kann, musste zunächst die Bindung an den nativen membranständigen IL-6R auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Fluoreszenz-basierten Methoden der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Mit Hilfe dieser Methoden ist eine schnelle Analyse der Zell-spezifischen Interaktion von Zielmolekülen und Nukleinsäuren durchführbar [58, 59, 140, 162]. Als Studienobjekt wurde die murine prä-B-Zelllinie BAF/3 favorisiert, da hier schon erfolgreich die spezifische Interaktion mit dem Aptamer 16-3 gezeigt werden konnte [6]. Es wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien gearbeitet. Zum einen wurden BAF/3-Zellen mit der cDNA für gp130 stabil transfiziert (BAF/3_gp130), zum anderen zusätzlich mit der cDNA für den hIL-6R (BAF/3_gp130_hIL-6R). Dies sollte die Detektion spezifischer Wechselwirkungen garantieren. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rose-John (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt. Während der Kultivierung der Zellen (BAF/3_gp130) konnte durch Zugabe von Hyper-IL-6 zum Medium die Produktion des Glykoproteins gp130 und ein Überleben der Zellen sichergestellt werden. Ebenso übte IL-6 im Kulturmedium von BAF/3_gp130_hIL-6R-Zellen einen Selektionsdruck aus und sicherte die Produktion des humanen IL-6-Rezeptors. Die Produktion dieser Proteine war die Grundvoraussetzung für die Nutzung dieses Zellkultursystems und konnte sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 5-20 bis Abbildung 5-22).

Unter Anwendung dieser beiden Methoden konnte eindeutig gezeigt werden, dass das am 5'-Ende Fluoreszenz-markierte Aptamer 16-3A_Atto647N zur spezifischen Bindung an den nativen IL-6R fähig war. Dies äußerte sich in einem deutlichen Fluoreszenz-*Shift* (Durchflusszytometrie; Abbildung 5-24) bzw. einer roten Färbung der Zellen (Fluoreszenzmikroskopie; Abbildung 5-23). Die Atto647N-markierte Punktvariante 16-3A_G17U zeigte dagegen keine Interaktion mit dem membrangebundenen IL-6R. Die Bindung des Aptamers 16-3A_Atto647N beschränkte sich auf die Zelllinie BAF/3_gp130_hIL-6R. Somit war die Spezifität der Wechselwirkung sicher gestellt. Da das für den löslichen IL-6R selektierte Aptamer 16-3 ebenfalls zur spezifischen Bindung an den nativen membranständigen Rezeptor auf der Oberfläche von Zielzellen fähig war [6],

überraschte es nicht, dass auch die minimierte Form des Aptamers eine Affinität für den nativen IL-6R aufwies.

Wie viele Rezeptormoleküle des IL-6-Rezeptors auf der Zelloberfläche von BAF/3-Zellen membranständig präsentiert wurden, war nicht bekannt. Als Anhaltspunkt diente die Studie von Meyer, C., in der beim Einsatz von 10 pmol des Fluoreszenz-markierten RNA-Aptamers 16-3 (6×10^{12} Moleküle) unter Verwendung von 500.000 Zellen (BAF/3_gp130_hIL-6R) in 350 μ L Selektionspuffer ein deutlicher Fluoreszenz-Shift verzeichnet wurde [6]. Um die konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers an Zellen, die den humanen IL-6-Rezeptor membranständig tragen, nachzuweisen, wurden Lösungen verschiedener Konzentration des Fluoreszenz-markierten Aptamers 16-3A am Durchflusszytometer mit BAF/3_gp30_hIL6R-Zellen vermessen. Dabei zeigte sich, dass ab einer Konzentration von $\sim 8,5$ nM (3 pmol) die halbmaximale Sättigung im durchschnittlichen Fluoreszenzsignal erreicht wurde (Abbildung 5-25). Dieser apparente K_d -Wert zeugt von einer hohen Affinität des Aptamers zum nativen Rezeptor und liegt in der gleichen Größenordnung wie die Dissoziationskonstanten, welche über *in vitro* Studien (SPR, $K_d \sim 8,5$ nM & Filterbindung, $K_d \sim 67$ nM) erhalten wurden. Die Bestimmung der Affinität von Aptameren zu Zielmolekülen mittels Durchflusszytometrie wurde von Shangguan et al. eingeführt [58]. Über eine Zell-SELEX konnten DNA-Aptamere mit K_d -Werten im nanomolaren Bereich selektiert werden, die spezifisch Leukämiezellen wie z. B. CCRF-CEM, Ramos und Toledo erkennen [162]. Um Dissoziationskonstanten des Aptamers für den nativen Rezeptor und die mögliche Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu bestimmen, könnten weiterhin radioaktive Bindungsstudien durchgeführt werden. So konnten Zohlnhöfer et al. mit iodiertem IL-6 die Affinität des Zytokins zu seinem Rezeptor auf IL-6R-tragenden HepG2-Zellen bestimmen. Weiterhin wurde die Anzahl der beteiligten Rezeptoren durch Scatchard-Analysen berechnet [4]. Auch bei IL-6R-exprimierenden COS-7-Zellen wurde diese Methode erfolgreich angewandt [29].

6.4. Identifikation der Aptamerbindungsstelle am IL-6R

In der Arbeit von Meyer, C. konnte in Kompetitionsstudien bereits gezeigt werden, dass das Aptamer 16-3 nicht mit IL-6 um die Bindestelle am Hyper-IL-6 konkurriert und auch eine Komplexbildung mit sgp130 weiterhin möglich ist [6]. Da die Domänen D2 und D3 für die Interaktionen des IL-6-Rezeptors mit IL-6 bzw. gp130 verantwortlich sind [18], wurde entgegen früheren Annahmen [6] davon ausgegangen, dass die Binderegion des Aptamers in

der D1-Domäne des Rezeptors liegen könnte. Mittels radioaktiver Filterbindungsstudien konnte eine Affinität des Aptamers 16-3A zur D3-Domäne des Rezeptors ausgeschlossen werden (Abbildung 5-35). Somit blieben als mögliche Bindestellen des Aptamers die D1 und die D2 Domänen des Rezeptors.

Um die mögliche Bindestelle des Aptamers an den Rezeptor weiter einzuschränken, wurden durchflusszytometrische Kompetitionsstudien mittels eines monoklonalen anti-IL-6R Antikörpers durchgeführt. Unter Anwendung der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass das eingesetzte Aptamer nicht mit dem Antikörper um die Bindung an den Rezeptor kompetiert (Abbildung 5-36). Der anti-IL-6R-Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop in der Region der D2/D3 Domäne [141]. Somit wurde ein weiterer Hinweis für die Bindung des Aptamers an die D1 Domäne erhalten.

6.5. IL-6R-vermittelte Internalisierung des Aptamers 16-3A

Die Endozytose von Membranrezeptoren ist weit verbreitet und kann verschiedene Funktionen, wie die Aufnahme von Nahrungspartikeln, Antigenen oder Botenstoffen haben [163]. So wird z. B. Eisen über das Glykoprotein Transferrin im Serum transportiert und von Transferrinrezeptoren auf Zielzellen über Endozytose aufgenommen [4]. Viele Rezeptor-Tyrosin-Kinasen werden nach Liganden-Bindung vermehrt internalisiert und in verschiedene endosomale Kompartimente sortiert. Dies ermöglicht Zellen auf unterschiedliche Einflüsse entsprechend zu reagieren. Als Beispiel sei der EGFR (*epidermal growth factor receptor*) genannt [164]. Auch für den IL-6R wurde die Liganden-induzierte Endozytose beschrieben. So liegt die Halbwertszeit des IL-6-Rezeptores ohne IL-6 in Hepatozyten bei etwa sieben Stunden. Durch die Anwesenheit des Zytokins wird die Halbwertszeit auf ca. 30 min verkürzt [4]. Vermittelt wird die Internalisierung über gp130, dessen cytoplasmatische Domänen dabei eine wichtige Rolle spielen [29]. Allerdings ist der IL-6R auch ohne gp130 fähig, zu internalisieren, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Durch die Internalisierung und der Verminderung des Rezeptors auf der Zelloberfläche kann einer Überstimulierung durch IL-6 entgegengewirkt werden. Dabei wird der Rezeptor zusammen mit IL-6 nach Endozytose im Lysosomen abgebaut. Ohne Bindung des Zytokins wird der endozytierte Rezeptor recycelt und erneut an der Zelloberfläche positioniert [29].

Aufgrund fortlaufender Recycling-Prozesse des IL-6-Rezeptors wurde die Möglichkeit der Rezeptor-vermittelten Endozytose des Aptamers 16-3A untersucht. Eine Option, die

Internalisierung von Rezeptoren zu untersuchen, ist ein Temperatur-*Shift* von 4°C auf 37°C. So konnten *Choi et al.* die Internalisierung des EGFRs (*epidermal growth factor receptor*) bei BAF/3-Zellen durch Erhöhung der Temperatur auslösen und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachweisen. Bei Inkubation der Zellen auf Eis konnte keine Internalisierung des Rezeptors detektiert werden [165]. Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnten eindeutige Hinweise auf die Internalisierung des Atto647N-markierten Aptamers 16-3A von hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen erhalten werden (Abbildung 5-26). Dies äußerte sich in unterschiedlich stark ausgeprägten Fluoreszenz-*Shifts*, welche von der Inkubationstemperatur abhängig waren. Dabei konnte durch die Behandlung der Zellen mit der Protease Trypsin auf der Zelloberfläche verbliebenes Rezeptor-gebundenes Aptamer z. T. entfernt werden (Abbildung 5-26 A). Bereits mit dem Rezeptor internalisiertes Aptamer war für die Trypsin-Behandlung nicht zugänglich. Die Entfernung von Rezeptor-gebundenem Aptamer durch Trypsin und den Nachweis der Zell-spezifischen Aptamer-Internalisierung mittels Durchflusszytometrie wurde in vergleichbaren Studien von *Xiao et al.* durchgeführt. Hier führte die spezifische Endozytose des DNA-Aptamers *sgc8* über PTK7 (*proteine tyrosine kinase 7*) zur Lokalisation in Endosomen [140]. Trypsin ist eine Endopeptidase, welche Proteine spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet [166]. Somit werden alle auf der Zellmembran exponierten Proteine unspezifisch degradiert. Neben der Protease Trypsin wurde der membranständige IL-6R durch die Stimulation von PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) *geshedded* [26, 167]. Dabei bindet der Phorbol-ester direkt an die Proteinkinase C, wodurch eine Signaltransduktion ausgelöst wird. Diese führt zur Aktivierung der Proteasen ADAM10 /17, welche den sIL-6R frei setzen. Hierfür wurde an die Inkubation der BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen mit dem Atto647N-markierten Aptamer 16-3A (auf Eis bzw. bei 37°C) eine zweistündige Inkubation unter Zugabe von PMA angeschlossen. Dies sollte die spezifische Entfernung des IL-6R, gegenüber der ungerichteten Proteolyse durch Trypsin, sicherstellen. Mittels FACS-Analysen konnte das spezifische *Shedding* des IL-6R gezeigt werden. Dabei ging das Fluoreszenzsignal, als ein Maß für die Anzahl des membrangebundenen IL-6R, nach Stimulation von BAF/3-Zellen durch PMA zurück. Das Glykoprotein gp130 war vom *Shedding* nicht betroffen. Für diese Analysen wurden die Rezeptor-spezifischen Antikörper verwendet (Daten nicht gezeigt). Durch die Generierung des sIL-6R wurde noch an den löslichen Rezeptor gebundenes Aptamer ins Medium abgegeben und konnte somit mittels Durchflusszytometrie nicht mehr detektiert werden.

Bereits internalisiertes Aptamer (37°C) war davon nicht betroffen. Dies äußerte sich in unterschiedlich ausgeprägten Fluoreszenz-*Shifts*, die abhängig von der Inkubationstemperatur waren (Abbildung 5-26 B).

Dabei konnte durch die Behandlung der Zellen mit Trypsin bzw. PMA das Fluoreszenz-Signal nicht auf den Wert der Autofluoreszenz reduziert werden, sofern die Zellen mit dem Aptamer auf Eis inkubiert wurden. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Teil des Aptamers während der Inkubation mit Trypsin/PMA internalisiert wurde. Als weitere Erklärung sei vermerkt, dass das *Shedding* bzw. die Proteolyse durch Trypsin nicht zu 100% ablaufen, und somit noch membranständiger Rezeptor mit gebundenem Aptamer auf der Zelloberfläche verbleiben. Eine Umkehrung der einzelnen Schritte bei der Versuchsdurchführung, zunächst *Shedding* bzw. Proteolyse des IL-6-Rezeptors und im Anschluss eine Inkubation mit dem markierten Aptamer zeigte, dass das Aptamer 16-3A noch in der Lage war an BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen zu binden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass eine Behandlung der Zellen mit Trypsin /PMA einen großen Teil des IL-6R, aber diesen nicht vollständig, entfernt.

Noch an den membranständigen IL-6R gebundenes Aptamer könnte neben Trypsin auch durch Ribonukleasen entfernt werden. *Li et al.* konnten dies für ein Konjugat aus Aptamer und Gold-Nanopartikeln zeigen [122]. Eine Behandlung von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen mit RNase A, welche zuvor mit dem Aptamer 16-3A_Atto647N inkubiert worden waren, führte nicht zu einer Minderung des Fluoreszenzsignals (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte von *Magbanua* beschrieben werden, dass durch RNase T1 das Rezeptor-gebundene Aptamer 16-3A degradiert wird [5]. Beide Enzyme nutzen ssRNA als Substrat. RNase A erkennt Pyrimidine und spaltet die Phosphordiesterbindung an der 5'-Position der Ribose des jeweils in der RNA-Kette auf U bzw. C folgenden Nukleotids [168]. RNase T1 hingegen spaltet spezifisch nach Guanin-Resten [169]. In der Sequenz des Aptamers 16-3A sind lediglich vier Pyrimidine, hingegen dreizehn Guanine, vorhanden. Daher wurde vermutet, dass die Spaltung des gebundenen Aptamers durch RNase A erschwert war. Dies könnte sterische Ursachen, sowie den Schutz der Pyrimidine durch den gebundenen Rezeptor als Grund haben.

Die Internalisierung des Aptamers 16-3A über den IL-6R konnte mittels konfokaler Mikroskopie verifiziert werden. Es zeigte sich, abhängig bei welcher Temperatur die Inkubation mit dem Atto647N-markierten Aptamer 16-3A durchgeführt wurde, ein

signifikanter Unterschied in der Färbung der hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen. Nur bei 37°C konnte das Aptamer auch intrazellulär und nicht nur an der Zellmembran detektiert werden (Abbildung 5-28). Durch Trypsin wurde das an den membranständigen IL-6R gebundene Aptamer zusammen mit dem Rezeptor entfernt, sodass nur das internalisierte Aptamer visualisiert wurde. Die Punktvariante des Aptamers G17U wurde hingegen nicht von den Zellen aufgenommen (Abbildung 5-29). Auch waren BAF/3_gp130-Zellen nicht in der Lage, das Aptamer 16-3A zu internalisieren. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine unspezifische Aufnahme von Fluoreszenz-markierter RNA ausgeschlossen werden. Eine spezifische Internalisierung von Fluoreszenz-markierten Aptameren in Konjugation mit einem Zielprotein (Angiogenin) wurde z. B. von *Li et al.* gezeigt. Mittels konfokaler Aufnahmen konnte die temperatur- und zeitabhängige Internalisierung verdeutlicht werden [170].

Um zu garantieren, dass das visualisierte Aptamer wirklich intrazellulär lokalisiert ist, wurden konfokale Bilder angefertigt, bei der die Zellen schichtweise durch die Aufnahme eines *z-stacks* gescannt wurden. So sollte sichergestellt werden, dass es sich nicht um Artefakte bei den zuvor aufgenommenen Bildern handelt, indem nur Reste des auf der Zelloberfläche befindlichen Aptamers detektiert wurden. Diese Annahme konnte durch die konfokale Aufnahme eines *z-stacks* verworfen werden (Abbildung 5-30). Optimal wäre zusätzlich eine Anfärbung des Zellkerns oder des Endosoms um die intrazelluläre Verteilung des internalisierten Aptamers zu verdeutlichen. Ob es sich bei dem detektierten Signal um das intakte Aptamer handelte, oder nur noch um den Fluoreszenzfarbstoff, blieb ungeklärt. Es wurde vermutet, dass sich das Aptamer in Endosomen befand, da dies bereits für andere internalisierte Aptamere beschrieben wurde [109, 140]. Hier könnten Co-Lokalisationsstudien mit Endosomen-spezifischen Antikörpern Gewissheit bringen. Aufgrund von ATP-getriebenen Protonenpumpen liegt der pH-Wert des Endosoms gewöhnlich im sauren Bereich. Dadurch können internalisierte extrazelluläre Moleküle ihre Strukturen ändern und gebundene Substanzen freisetzen [140, 171]. Ob dies auch für internalisierte Aptamere gilt, ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnten *Chu et al.* erstmals einen sensitiven Linker zwischen PSMA-Aptamer und einer siRNA platzieren, welcher nach Eintritt ins Endosom aufgebrochen wurde. Nach Zelltyp-spezifischer Internalisierung des Konjugates wurde die Expression der entsprechenden Zielgene (*lamin A/C*, *gapdh*) mittels RNA-Interferenz herunterreguliert [109].

Die Internalisierung des IL-6R wird hauptsächlich durch eine Bindung von IL-6 ausgelöst [4]. Daher stellte sich die Frage, ob die Internalisierung des Aptamers durch die Anwesenheit von IL-6 verstärkt wird bzw. vom Zytokin sogar abhängig ist. Diese Vermutungen konnten nicht bestätigt werden. Auch ohne IL-6 konnte die Internalisierung mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abbildung 5-31). Im direkten quantitativen Vergleich der Bindung bzw. Internalisierung des Aptamers 16-3A machte es ebenfalls keinen Unterschied, ob IL-6 während der Inkubationsphase zugesetzt war oder nicht. Interleukin-6 bindet mit hoher Affinität an den IL-6R [129]. Daher konnte nicht zu 100% ausgeschlossen werden, dass trotz intensiven Waschens das Zytokin unvollständig entfernt wurde. Insgesamt verlief die Internalisierung des Aptamers in einem kurzen Zeitraum, bereits nach nur 10 min Inkubation war das Aptamer innerhalb der Zellen zu detektieren. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass durch die Bindung des Aptamers die Internalisierung des IL-6-Rezeptors beschleunigt wird.

Um das Aptamer als *Delivery*-Vehikel nutzen zu können, sollten die Auswirkungen der Internalisierung bekannt sein. Es zeigte sich, dass die Bindung bzw. Internalisierung des Aptamers keine Auswirkung auf eine Phosphorylierung und damit die Stimulierung von mSTAT3 hat (Abbildung 5-32). Da das Aptamer nicht mit IL-6 um die Bindestelle beim IL-6R konkurriert und keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit gp130 hat [6], war dieses Ergebnis zu erwarten. Erst durch die Komplexbildung aus IL-6, dem IL-6R und gp130 werden mit gp130 assoziierte Januskinasen stimuliert und phosphorylieren den Transkriptionsfaktor STAT3. Dieser wandert nach Dimerisierung in den Zellkern ein und veranlasst die Expression zahlreicher Zielgene (Abbildung 1-5) [18]. Ein Aptamer, welches als Agonist die Oligomerisierung von Zellrezeptoren veranlasst, konnte von *McNamara et. al.* konstruiert werden. Hier führte die Multimerisierung des Aptamers M12-23 zum *Cross-Linking* des Rezeptors 4-1BB und damit zur Stimulierung und Proliferation von aktivierten T-Zellen [172]. Die Auswirkung der Aptamerbindung bzw. -internalisierung auf die Proliferationsrate von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit untersucht. Wie bereits vermutet, führte das Aptamer 16-3A nicht zu einer Stimulation der Proliferation (Abbildung 5-33). Die murine prä-B-Zelllinie BAF/3 wird in Abhängigkeit von IL-3 in Kultur gehalten. Durch die Präsentation der Rezeptoren gp130 und hIL-6R ist eine zusätzliche Stimulation über IL-6 möglich. Dies geschieht über die Signaltransduktion von STAT3. Da im Western-Blot bereits die Phosphorylierung und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors

durch das Aptamer ausgeschlossen wurde (Abbildung 5-32), war eine proliferationssteigernde Wirkung des Aptamers auch nicht erwartet worden. Weiterhin konnte mittels der durchgeführten Proliferationsanalysen gezeigt werden, dass eine Bindung bzw. Internalisierung des Aptamers 16-3A keine negativen Einflüsse auf die Proliferationsrate von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen hat. Anders verhält sich ein von *Cerchia et al.* selektiertes Aptamer mit Spezifität für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase RET. Hier führte die Inkubation von RET-präsentierenden Zellen mit dem DNA-Aptamer D4 zu einer verminderten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK und damit zur Unterbrechung der Signalkaskade. Die Proliferation und Differenzierung von Zellen, welche mit dem Aptamer D4 inkubiert wurden, war deutlich herabgesetzt [173]. Ursache hierfür ist die Inhibierung der Dimerisierung der Tyrosinkinase RET durch das Aptamer. Somit scheint die Inhibition der Komplexbildung von Rezeptoren eine Grundvoraussetzung dafür zu sein, Einfluss auf die Signalkaskade auszuüben.

Auch die Frage nach möglichen zytotoxischen Einflüssen nach Internalisierung des Aptamers wurde untersucht. Dabei konnte auch bei einer Konzentration des Aptamers von 1 μ M kein negativer Effekt auf die Zellvitalität von hIL-6R-tragenden BAF/3-Zellen detektiert werden (Abbildung 5-34). Diese Beobachtung stand somit im Einklang zu früheren Berichten, in denen internalisierten Aptameren (z. B. dem PSMA-Aptamer) per se keine zytotoxischen Auswirkungen bescheinigt wurden [105, 140].

6.6. Chimären aus dem Aptamer 16-3A und Sequenzen für siRNAs

Um die Internalisierung des Aptamers nicht nur mittels Fluoreszenz-basierter Methoden zu zeigen, sondern auch einen biologischen Effekt innerhalb der Zellen auszulösen, wurde das Aptamer 16-3A mit siRNAs verknüpft. Dies sollte zum einen den eindeutigen Beweis der Internalisierung ermöglichen, zum anderen die Funktionalisierung des Aptamers als Zelltyp-spezifisches *Delivery*-Reagenz hervorheben. Dabei wurden als Zielproteine die Transkriptionsfaktoren mSTAT3 und mSTAT5 gewählt. Diese Strategie sollte die mögliche Verminderung der Genexpression auf zwei Ebenen verdeutlichen. Mittels Western-Blot-Analyse könnte die Produktion der Proteine untersucht werden. Weiterhin hängt die Zellvitalität bzw. die Proliferationsrate von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen stark von den genannten Transkriptionsfaktoren ab. Somit ist es auch möglich, anhand von Proliferationsstudien auf die Produktionsstärke der Proteine mSTAT3/5 zu schließen.

Die Aptamer-siRNA-Chimären wurden so konstruiert, dass sie mittels T7-Transkription leicht zu produzieren waren. Dies setzte voraus, dass die Sequenz am 5'-Ende mit den Basen GG beginnen sollte, damit die T7-RNA-Polymerase effizient transkribieren kann. Da nur wenige Sequenzen für siRNAs mit dem Ziel murines STAT3 bzw. STAT5 veröffentlicht sind und keine von diesen mit den Basen GG beginnt, wurden potentielle siRNA-Sequenzen mit einem online verfügbaren *target finder* ermittelt [142]. Für jedes Zielprotein wurden zwei verschiedene siRNA-Sequenzen definiert, welche unterschiedliche Bereiche der mRNA ansteuern. Diese wurden sowohl mit dem Aptamer 16-3A als auch der Punktvariante G17U fusioniert. Als Negativkontrolle wurde weiterhin die Basenabfolge der siRNAs *gescrambled*. Somit wurden insgesamt zwölf Chimären (Tabelle 5-6) über T7-Transkription produziert und präparativ gereinigt. Dabei fiel auf, dass die produzierten Chimären mit dem Ziel mSTAT3 kein homogenes Laufverhalten in denaturierenden PAA-Gelen aufwiesen (Abbildung 5-38). Hierbei ist es denkbar, dass die Transkription von der T7-RNA-Polymerase vorzeitig abgebrochen wurde. Dies könnte eventuell aufgrund von sterischen Hinderungen durch die Ausbildung des G-Quadruplexes der Fall sein. Allerdings wiesen die Transkriptionsprodukte doch in etwa die erwartete Länge von 71 nt auf. Daher ist zu vermuten, dass die Unterschiede im Laufverhalten womöglich auf Unterschiede in der Basenzusammensetzung zurückzuführen sind [145].

Über Sekundärstrukturanalysen konnte der Aufbau der Aptamer-siRNA-Chimären schematisch verdeutlicht werden (Abbildung 5-37). Dabei nahm das Aptamer eine geöffnete Form an, da mit Hilfe des *Mfold web Servers* keine dreidimensionalen Strukturen wie ein G-Quadruplex dargestellt werden können [138]. Verbunden wurde das Aptamer 16-3A mit den siRNAs über einen dsRNA Linker von sechs Basenpaaren. Somit wies die Struktur der konstruierten Chimären große Ähnlichkeit mit einer microRNA (miRNA) auf, die von Dicer effizient prozessiert werden kann [103, 104]. Um die Effektivität der Chimären zu erhöhen, wurde zusätzlich ein zwei Nukleotid-Überhang am 3'-Ende eingebaut [174].

Zunächst konnte mittels analytischer Filterbindungsstudien sichergestellt werden, dass die Fusion von siRNAs an das Aptamer 16-3A keine negativen Auswirkungen auf dessen Affinität zum IL-6R hatte. Zur Überprüfung der Affinität zum IL-6R wurde erneut das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 herangezogen. Dabei zeigten die Chimären mit dem Ziel mSTAT3/5 vergleichbare Affinitäten wie das Aptamer 16-3A ($K_d \sim 67$ nM). Die gemessenen K_d -Werte der Chimären

lagen im Bereich von $K_d \sim 30\text{-}100\text{ nM}$. Auch der Anteil der maximalen Bindung (20-40%) war mit dem des Aptamers 16-3A (30%) gut vergleichbar (Tabelle 5-7 & Tabelle 5-8).

Die Affinität zum nativen IL-6R konnte für die Chimären mit dem Ziel mSTAT3 gezeigt werden. Dabei erwies es sich jedoch als schwierig, die Fluoreszenz-markierten Konstrukte in ausreichender Ausbeute zu produzieren. Als limitierender Schritt ist hier die Kopplung des Farbstoff-Maleimides an die mit GTPS aktivierte RNA zu nennen. Obwohl für diese Reaktion ca. 500 pmol an RNA eingesetzt wurde, konnten nach erfolgter Inkubation mit dem Farbstoff und erneuter Gelreinigung nur weniger als 10 pmol Fluoreszenz-markierter RNA erhalten werden. Eine effektivere Methode für die Fluoreszenzmarkierung könnte die Anwendung des Iodacetamidoverfahrens darstellen [35]. Weiterhin scheint der kommerzielle Erwerb chemisch synthetisierter RNAs mit einem Fluoreszenz-Marker für kurze Sequenzen empfehlenswert. Gleichwohl war es möglich, die Bindung der Aptamer-siRNA-Chimären an den membranständigen IL-6-Rezeptor auf BAF/3-Zellen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung der Chimären, welche das Aptamer 16-3A enthielten, eine Verschiebung im Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Im Gegensatz dazu blieb eine Bindung an die Zellen und damit ein Fluoreszenz-*Shift* in der durchflusszytometrischen Analyse aus, wenn die siRNAs mit der Punktvariante G17U des Aptamers fusioniert wurden. Auffällig war die unterschiedliche Stärke der Fluoreszenzverschiebung. Als Ursachen kommen unterschiedlich hohe Konzentrationen der eingesetzten Proben sowie verschieden hohe Markierungseffizienzen in Betracht. Es ist möglich, dass in den Proben ein hoher Anteil bzw. ein deutlicher Überschuss an nicht markierten Aptamer-siRNA-Chimären vorlag, welche um die Bindung an den membranständigen Rezeptor kompetierten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität von Aptamer-siRNA-Chimären ist ihre Eigenschaft als Substrat von Dicer akzeptiert zu werden. Die Chimären wurden so konstruiert, dass sie die Struktur einer prä-miRNA annehmen konnten (Abbildung 5-37). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene. Durch das Enzym Drosha werden im Nukleus sogenannte prä-miRNAs mit einer Länge von 70-80 nt prozessiert, welche eine Haarnadelstruktur ausbilden. Nach dem Transport ins Zytoplasma werden prä-miRNAs von Dicer in die charakteristischen miRNAs mit einer Länge von 19-22 nt geschnitten [106, 175] (Abbildung 1-9). Diese unterscheiden sich von siRNAs durch ihre nicht zu 100% übereinstimmende Komplementarität gegenüber ihrer Ziel-mRNA und dem daraus resultierenden Mechanismus

der *Downregulation*. Zudem liegen die Zielsequenzen von miRNAs meist in der 3'-untranslatierten Region, wohingegen die Zielsequenzen für siRNAs in der kodierenden Region der mRNA lokalisiert sind.

Die radioaktiv markierten Chimären konnten mit rekombinantem humanem Dicer prozessiert werden (Abbildung 5-47). Dabei wurden die Proben mit oder ohne Enzym inkubiert und die Proben über eine denaturierende PAGE analysiert. Bei Zugabe von Dicer konnten Fragmente mit der charakteristischen Größe von ~ 20 nt detektiert werden. Dabei fiel auf, dass die Menge der absoluten Radioaktivität bei Zugabe des Enzyms abnahm. Innerhalb von Dicer dient ein als *Connector-Helix* bezeichneter Abschnitt als interne Messgröße für die entstehenden Produkte [176]. Dabei verläuft das Schneiden durch Dicer nicht homogen und es können Produkte unterschiedlicher Größe entstehen [177]. Die untersuchten Proben wurden mit Hilfe der T4-PNK am 5'-Ende mit ^{32}P markiert. So ist es möglich, dass ein Großteil des markierten 5'-Endes der Chimären von Dicer abgeschnitten wurde. Hier könnte ein Vergleich mit intern oder am 3'-Ende markierten Chimären Aufschluss bringen. Insgesamt waren die Ergebnisse jedoch gut vergleichbar mit bereits in Dicer-Assays untersuchten Aptamer-siRNA-Chimären, bei denen ebenfalls Fragmente mit einer charakteristischen Größe von 19-22 nt detektiert werden konnten [105, 110].

Um die biologische Aktivität der Aptamer-siRNA-Chimären zu analysieren, wurden BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen mit den Chimären transfiziert. Zuvor wurden die Bedingungen für die Verminderung der Produktion von mSTAT3 mit einer kommerziellen anti-mSTAT3-siRNA optimiert (Abbildung 5-48 A). Die in Suspension wachsende Zelllinie BAF/3 ließ sich nicht in ausreichendem Maße mit üblichen Transfektionsreagenzien transfizieren (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf eine Kombination von Elektroporation und chemischer Transfektion zurückgegriffen und die Zellen mit der Nucleofactor® Technologie transfiziert. Auf diese Weise wurden Transfektionseffizienzen von über 60% erreicht (Abbildung 5-48 B). Für ein effizientes *Silencing* von phosphoryliertem mSTAT3 war eine Konzentration von ca. 30 nM an siRNA ausreichend und wurde auch bei einer Konzentration von 300 nM noch beobachtet. Um in Western-Blot-Analysen die Verminderung der STAT3-Produktion zu detektieren, war eine Inkubation von 48 h nach erfolgter Transfektion nötig (Abbildung 5-48). Diese Parameter deckten sich gut mit bereits veröffentlichten Studien über die Herunterregulation von STAT3 [178].

Nach erfolgter Transfektion von BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen mit den Chimären konnte keine Verminderung der phosphorylierten Transfektionsfaktoren (mSTAT3/5) mittels Western-Blots detektiert werden. Lediglich die zuvor getestete anti-mSTAT3-siRNA führte zu einem Verlust der Proteinproduktion. Als Primärantikörper wurden monoklonale Antikörper gegen pSTAT3 bzw. pSTAT5 verwendet. Die Halbwertszeit von phosphorylierten STAT-Proteinen liegt bei maximal zwei Stunden, je nachdem ob die α - oder β -Form betrachtet wird [179]. Zur Evaluierung der Ergebnisse könnte ein Primärantikörper, welcher die unphosphorylierten Transkriptionsfaktoren detektiert, zusätzlich eingesetzt werden.

Neben der Transfektion von hIL-6R-tragenden Zellen mit den Chimären, wurden diese ins Medium (ohne FKS) bzw. Selektionspuffer von kultivierten BAF/3_gp130_hIL6R-Zellen hinzugefügt. Auch nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose der Chimären konnte weder im Western-Blot, noch durch Analyse des Proliferationsverhaltens auf eine Verminderung des phosphorylierten Transkriptionsfaktors geschlossen werden (Abbildung 5-50). So wurde vermutet, dass die produzierten Chimären keinen Einfluss auf die Produktion von mSTAT3/5 nehmen konnten. Als mögliche Ursachen kommen zahlreiche Gründe in Betracht. Es ist denkbar, dass der Effekt des *Silencing* vorhanden, aber nicht so stark ausgeprägt war, wie von der kommerziellen anti-mSTAT3-siRNA. Somit könnte ein Western-Blot eine nicht ausreichend sensitive Methode darstellen. Die Detektion des *Silencing*-Effektes ist auch auf der Ebene der mRNA möglich. Mittels quantitativer-RT-PCR (qRT-PCR) ist es möglich auch geringe Effekte eindeutig zu identifizieren. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass alle der gewählten siRNA-Sequenzen keine biologische Aktivität aufweisen. Dies könnte eine Transfektion von BAF/3-Zellen mit den siRNAs ohne Verknüpfung mit der Aptamer-Sequenz klären. So hängt die Funktionalität von siRNAs von mehreren Faktoren ab, und nicht selten müssen zahlreiche Sequenzen überprüft werden, um eine funktionelle Sequenz zu identifizieren [174]. So kann die mRNA im Bereich der siRNA-Ziel-Sequenz durch die Bindung von Proteinen sterisch nicht zugänglich sein. Auch vermindern starke dreidimensionale Strukturen in der Zielsequenz die Chance auf ein erfolgreiches *Silencing* [180]. Weiterhin wird nicht jede si/miRNA von Dicer gleich effektiv prozessiert und in den RISC-Komplex eingebaut. So spielt die thermodynamische Stabilität der 5'-Enden eine wichtige Rolle [174, 177].

Um die Internalisierung der Aptamer-siRNA-Chimären für mSTAT3/5 dennoch nachzuweisen und die mögliche Prozessierung von Dicer zu analysieren, könnten *small_fragment*-

Northern-Blots sowie eine RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) angewendet werden [110].

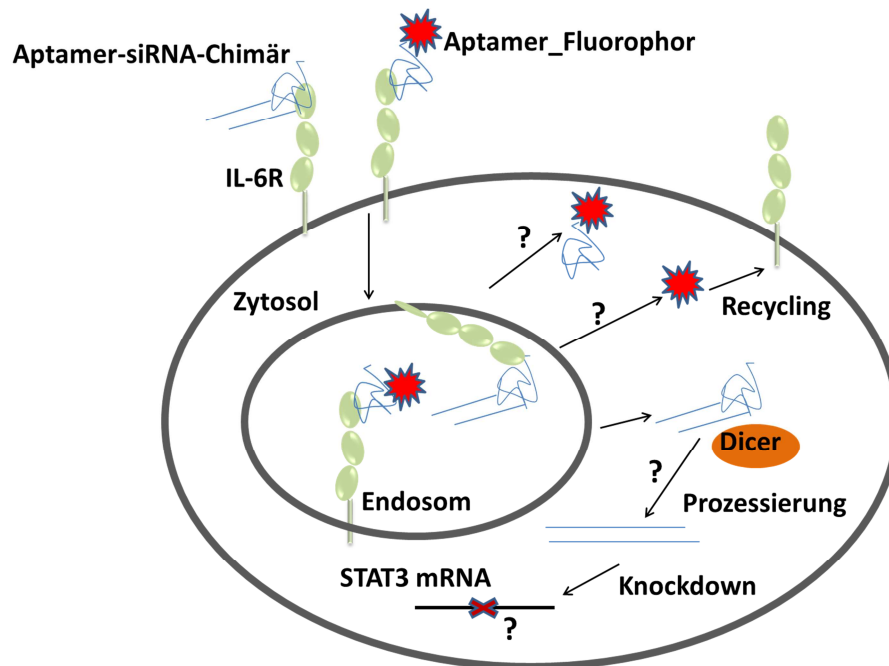


Abbildung 6-2: Mögliche Prozesse nach Internalisierung des Aptamers 16-3A.

Durch die Internalisierung des IL-6-Rezeptors wird daran gebundenes Aptamer vermutlich ins Endosom transportiert. Der Ablauf der Freisetzung ist nicht geklärt. Eine mögliche Option ist ein als *Endosomal Escape* bezeichneter Prozess, bei dem das Aptamer ins Zytosol gelangt. Ob und wie lange das Aptamer im Zytosol stabil vorliegt, ist nicht bekannt. Die Detektion von Fluorophoren mittels Fluoreszenzmikroskopie lässt keinen Rückschluss auf das intakte, markierte Aptamer zu. Der IL-6R kann abgebaut oder recycelt und zur Membranoberfläche transportiert werden. Im Zytosol könnten internalisierte Aptamer-siRNA-Chimären durch Dicer in siRNAs prozessiert werden. Ob die entstandenen siRNAs vom RISC-Komplex akzeptiert und zum Knockdown von Zielgenen fähig sind, ist ebenfalls spekulativ.

7. Ausblick

Aufgrund ihrer Fähigkeit, eine dreidimensionale Faltung anzunehmen, können Aptamere ihre Zielmoleküle hoch affin und spezifisch binden. Als vorteilhaft erweisen sich ihre geringe Immunität, eine hohe Stabilität und eine leichte chemische Synthese, bei der eine Vielzahl von Modifizierungen eingebaut werden können. Diese besonderen Eigenschaften lassen sich für die pharmakologische Therapie nutzen und führen zu einem breiten Anwendungspotential von Aptameren [78].

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des RNA-Aptamers 16-3A und die Ermittlung der Eignung des Aptamers als putatives Vehikel für den Zell-spezifischen Transport von Substanzen. Die spezifische intrazelluläre Aufnahme des Aptamers konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Weiterhin führte die kovalente Verknüpfung mit siRNAs zu keiner Beeinträchtigung der Affinität. Auch die für die Bindung zum Zielprotein (IL-6R) essentiellen Basen konnten determiniert und ein 2'-F-modifiziertes Cytidin ohne großen Affinitätsverlust eingeführt werden. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden weitere Fragestellungen abgeleitet, die im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht geklärt werden konnten. Diese gilt es zukünftig zu klären.

Die an der Bindung zum IL-6-Rezeptor beteiligten Basen könnten noch detaillierter analysiert werden. So wäre mit Hilfe von *Chemical Probing* ein besseres Verständnis über die Sekundär-Struktur möglich. Dabei werden durch den Einsatz von Chemikalien wie DMS, Kethoxal oder CMCT (1-Cyclohexyl-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid) alle Nukleotide modifiziert, welche nicht in Basenpaarungen involviert sind [181]. Auch mittels *Enzymatic Probing* könnten unter Verwendung von Ribonukleasen wie RNase T1, V1, S1 oder A weitere Informationen bezüglich der Rezeptor-Aptamer-Interaktion gewonnen werden [182]. Zur Aufklärung der Tertiärstruktur wären röntgenkristallographische Analysen sowie NMR-Studien denkbar [183].

Die Blockade der IL-6 vermittelten Signalgebung durch die Wechselwirkung zwischen dem RNA-Aptamer 16-3A und dem IL-6R erweist sich als nicht realisierbar. Jedoch bietet die Rezeptor-spezifische Internalisierung des Aptamers 16-3A ein großes Potential. So könnte eine Verknüpfung des Aptamers mit wirksamen siRNAs nicht nur kovalent, sondern auch über Streptavidin oder einen *Sticky-Linker* erfolgen. In *proof of principle* Versuchen könnten publizierte siRNAs mit nachgewiesenem *Silencing*-Effekt, z. B. bezüglich STAT3 in Zielzellen

wie BAF/3_gp130_hIL6R oder HepG2, eingeschleust werden. Auf diese Weise wäre die Inhibierung des IL-6-Signalweges realisierbar. Der Nachweis der Verminderung von STAT3 könnte dabei nicht nur auf Protein-Ebene mit quantitativen Western-Blots, sondern auch auf mRNA-Ebene über qRT-PCR-Analysen, erbracht werden. Eine immunogene Wirkung der Chimären aus Aptamer und siRNA sollte durch Überprüfung einer Interferon-Antwort ausgeschlossen werden [105]. Neben einer Konjugation des Aptamers 16-3A mit siRNAs spezifisch für den IL-6 Signaltransduktionsweg oder für Zielmoleküle, welche in IL-6 assoziierten Krankheitsbildern involviert sind, ist eine Ansteuerung spezifischer Gene in Hepatozyten vorstellbar. Hier wäre eine Verminderung der Enzyme HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase) oder PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) denkbar, welche eine wichtige Rolle bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen [184].

Auch die Konjugation des Aptamers mit Toxinen wie Gelonin oder chemotherapeutisch wirksamen Substanzen wie Doxorubicin stellt zum einen einen sicheren Nachweis der Internalisierung dar und ermöglicht zudem einen therapeutischen Ansatz. Eine Konjugation von Aptamer und Nanopartikeln könnte bei der Visualisierung von siL-6R vermittelten Krankheitsbildern helfen [93, 126, 128].

Für eine spätere mögliche Anwendung des RNA-Aptamers 16-3A sind chemische Modifikationen unausweichlich um die Stabilität gegenüber dem nukleolytischen Abbau zu erhöhen. Als mögliche Optionen bieten sich ein invertiertes ThyminCap (3'-3'-dT_{Cap}), sowie der Einbau von 2'-F- und 2'-MeO-modifizierten Nukleotiden an. Um die renale Filtration zu verlangsamen und die Pharmakokinetik zu verbessern, könnte eine PEG-Einheit an das Aptamer angehängt werden [78, 92]. Eine hohe Spezifität und Affinität sollte auch nach Einbau post-selektiver Modifikationen gesichert sein.

Literaturverzeichnis

1. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. 300 (Pt 2): p. 281-90.
2. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. 175(6): p. 3463-8.
3. Taga, T., et al., *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. 58(3): p. 573-81.
4. Zohlnhofer, D., et al., *The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand*. FEBS Lett, 1992. 306(2-3): p. 219-22.
5. Magbanua, E., *Charakterisierung von Interleukin-6-Rezeptor spezifischen Aptameren*. persönliche Mitteilung
6. Meyer, C., *Interleukin-6-Rezeptor-spezifische RNA-Aptamere*, in *Chemistry*. 2009, University of Hamburg: Hamburg.
7. Scheller, J., *Interleukin-6. Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren*. BIOSpektrum, 2007.
8. Whicher, J.T. and S.W. Evans, *Cytokines in disease*. Clin Chem, 1990. 36(7): p. 1269-81.
9. Taga, T. and T. Kishimoto, *Cytokine receptors and signal transduction*. FASEB J, 1992. 6(15): p. 3387-96.
10. Ibelgaufts, H., ed. *Dictionary of cytokines*. 1995.
11. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. Blood, 1989. 74(1): p. 1-10.
12. Chalaris, A., et al., *Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils*. Blood, 2007. 110(6): p. 1748-55.
13. Smolen, J.S. and G. Steiner, *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(6): p. 473-88.
14. Helfgott, D.C., et al., *Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts*. J Exp Med, 1987. 166(5): p. 1300-9.
15. 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.
16. Kishimoto, T., et al., *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 1995. 86(4): p. 1243-54.
17. Mott, H.R. and I.D. Campbell, *Four-helix bundle growth factors and their receptors: protein-protein interactions*. Curr Opin Struct Biol, 1995. 5(1): p. 114-21.
18. 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.
19. Bazan, J.F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. Immunol Today, 1990. 11(10): p. 350-4.
20. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(18): p. 6934-8.
21. Yawata, H., et al., *Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130*. EMBO J, 1993. 12(4): p. 1705-12.

22. 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.
23. Hibi, M., et al., *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. 63(6): p. 1149-57.
24. www.conaris.de.
25. 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.
26. Mullberg, J., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol, 1993. 23(2): p. 473-80.
27. 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.
28. Dimitrov, S., et al., *Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans*. FASEB J, 2006. 20(12): p. 2174-6.
29. Dittrich, E., et al., *Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor*. J Biol Chem, 1994. 269(29): p. 19014-20.
30. Huang, S., *Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications*. Clin Cancer Res, 2007. 13(5): p. 1362-6.
31. 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.
32. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. J Leukoc Biol, 2006. 80(2): p. 227-36.
33. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. 195(4): p. 173-83.
34. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. 346(6287): p. 818-22.
35. Mayer, G., *The chemical biology of aptamers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(15): p. 2672-89.
36. 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.
37. Gold, L., *The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds*. Harvey Lect, 1995. 91: p. 47-57.
38. Joyce, G.F., *In vitro evolution of nucleic acids*. Curr Opin Struct Biol, 1994. 4: p. 331-6.
39. Huang, Z. and J.W. Szostak, *Evolution of aptamers with a new specificity and new secondary structures from an ATP aptamer*. RNA, 2003. 9(12): p. 1456-63.
40. Max Planck Institute for Molecular Genetics in Berlin. p. http://www.molgen.mpg.de/~nabt/images/fig2SELEX_procedure.png.
41. Berezovski, M., et al., *Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers*. J Am Chem Soc, 2005. 127(9): p. 3165-71.
42. Buchanan, D.D., et al., *Effect of buffer, electric field, and separation time on detection of aptamer-ligand complexes for affinity probe capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2003. 24(9): p. 1375-82.

43. Drabovich, A., M. Berezovski, and S.N. Krylov, *Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (ECEEM)*. J Am Chem Soc, 2005. 127(32): p. 11224-5.
44. Mendonsa, S.D. and M.T. Bowser, *In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis*. J Am Chem Soc, 2004. 126(1): p. 20-1.
45. 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.
46. Kubik, M.F., et al., *Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding*. J Immunol, 1997. 159(1): p. 259-67.
47. Pristoupil, T.I. and M. Kramlova, *Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes*. J Chromatogr, 1968. 32(4): p. 769-70.
48. Ulrich, H., et al., *In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(24): p. 14051-6.
49. Schurer, H., et al., *Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A*. Bioorg Med Chem, 2001. 9(10): p. 2557-63.
50. Muller, J., et al., *Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography*. Anal Bioanal Chem, 2008. 390(4): p. 1033-7.
51. Kraus, E., W. James, and A.N. Barclay, *Cutting edge: novel RNA ligands able to bind CD4 antigen and inhibit CD4+ T lymphocyte function*. J Immunol, 1998. 160(11): p. 5209-12.
52. Misono, T.S. and P.K. Kumar, *Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance*. Anal Biochem, 2005. 342(2): p. 312-7.
53. Cox, J.C. and A.D. Ellington, *Automated selection of anti-protein aptamers*. Bioorg Med Chem, 2001. 9(10): p. 2525-31.
54. Mayer, G., et al., *An RNA molecule that specifically inhibits G-protein-coupled receptor kinase 2 in vitro*. RNA, 2008. 14(3): p. 524-34.
55. Wochner, A., et al., *Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling*. Biotechniques, 2007. 43(3): p. 344, 346, 348 passim.
56. 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.
57. Morris, K.N., et al., *High affinity ligands from in vitro selection: complex targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(6): p. 2902-7.
58. Shangguan, D., et al., *Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(32): p. 11838-43.
59. Mayer, G., et al., *Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures*. Nat Protoc. 5(12): p. 1993-2004.
60. Huppert, J.L. and S. Balasubramanian, *Prevalence of quadruplexes in the human genome*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(9): p. 2908-16.
61. Lipps, H.J. and D. Rhodes, *G-quadruplex structures: in vivo evidence and function*. Trends Cell Biol, 2009. 19(8): p. 414-22.

62. Davis, J.T., *G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. 43(6): p. 668-98.
63. Burge, S., et al., *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(19): p. 5402-15.
64. Patel, D.J., A.T. Phan, and V. Kuryavyi, *Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics*. Nucleic Acids Res, 2007. 35(22): p. 7429-55.
65. Oganessian, L., et al., *Extension of G-quadruplex DNA by ciliate telomerase*. EMBO J, 2006. 25(5): p. 1148-59.
66. 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.
67. Bates, P.J., E.W. Choi, and L.V. Nayak, *G-rich oligonucleotides for cancer treatment*. Methods Mol Biol, 2009. 542: p. 379-92.
68. Bates, P.J., et al., *Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer*. Exp Mol Pathol, 2009. 86(3): p. 151-64.
69. Dapic, V., et al., *Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(8): p. 2097-107.
70. Dapic, V., et al., *Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications*. Biochemistry, 2002. 41(11): p. 3676-85.
71. Mori, T., et al., *RNA aptamers selected against the receptor activator of NF-kappaB acquire general affinity to proteins of the tumor necrosis factor receptor family*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(20): p. 6120-8.
72. Levesque, D., et al., *In vitro selection and characterization of RNA aptamers binding thyroxine hormone*. Biochem J, 2007. 403(1): p. 129-38.
73. Murakami, K., et al., *Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta isoform with high affinity*. Prion, 2008. 2(2): p. 73-80.
74. Jing, N., *Developing G-quartet oligonucleotides as novel anti-HIV agents: focus on anti-HIV drug design*. Expert Opin Investig Drugs, 2000. 9(8): p. 1777-85.
75. Choi, E.W., L.V. Nayak, and P.J. Bates, *Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides*. Nucleic Acids Res. 38(5): p. 1623-35.
76. Wu, C.C., et al., *Selection of oligonucleotide aptamers with enhanced uptake and activation of human leukemia B cells*. Hum Gene Ther, 2003. 14(9): p. 849-60.
77. Keefe, A.D. and S.T. Cload, *SELEX with modified nucleotides*. Curr Opin Chem Biol, 2008. 12(4): p. 448-56.
78. Keefe, A.D., S. Pai, and A. Ellington, *Aptamers as therapeutics*. Nat Rev Drug Discov. 9(7): p. 537-50.
79. Chakravarthy, U., et al., *Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2006. 113(9): p. 1508 e1-25.
80. Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2004. 351(27): p. 2805-16.
81. 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.
82. Bates, P.J., et al., *Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding*. J Biol Chem, 1999. 274(37): p. 26369-77.

83. Teng, Y., et al., *AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin*. Cancer Res, 2007. 67(21): p. 10491-500.
84. Cooper, C.L., et al., *Immunostimulatory effects of three classes of CpG oligodeoxynucleotides on PBMC from HCV chronic carriers*. J Immune Based Ther Vaccines, 2008. 6: p. 3.
85. Yu, D., et al., *Modifications incorporated in CpG motifs of oligodeoxynucleotides lead to antagonist activity of toll-like receptors 7 and 9*. J Med Chem, 2009. 52(16): p. 5108-14.
86. Krieg, A.M., *Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(6): p. 471-84.
87. Krieg, A.M., *Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer*. Oncogene, 2008. 27(2): p. 161-7.
88. Sheehan, J.P. and H.C. Lan, *Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex*. Blood, 1998. 92(5): p. 1617-25.
89. Goebel, N., et al., *Development of a sensitive and specific in situ hybridization technique for the cellular localization of antisense oligodeoxynucleotide drugs in tissue sections*. Toxicol Pathol, 2007. 35(4): p. 541-8.
90. Jo, N., et al., *Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization*. Am J Pathol, 2006. 168(6): p. 2036-53.
91. Barbas, A.S., et al., *Aptamer applications for targeted cancer therapy*. Future Oncol. 6(7): p. 1117-26.
92. Bouchard, P.R., R.M. Hutabarat, and K.M. Thompson, *Discovery and development of therapeutic aptamers*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 50: p. 237-57.
93. Zhou, J. and J.J. Rossi, *Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery*. Oligonucleotides. 21(1): p. 1-10.
94. Cao, Z., et al., *Reversible cell-specific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(35): p. 6494-8.
95. Dhar, S., et al., *Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(45): p. 17356-61.
96. Farokhzad, O.C., et al., *Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(16): p. 6315-20.
97. Farokhzad, O.C., et al., *Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. 64(21): p. 7668-72.
98. Ferreira, C.S., et al., *Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(3): p. 866-76.
99. Gu, F., et al., *Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(7): p. 2586-91.
100. Huang, Y.F., et al., *Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells*. Chembiochem, 2009. 10(5): p. 862-8.
101. Taghdisi, S.M., et al., *Targeted delivery of daunorubicin to T-cell acute lymphoblastic leukemia by aptamer*. J Drug Target. 18(4): p. 277-81.
102. Wang, A.Z., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy*. ChemMedChem, 2008. 3(9): p. 1311-5.
103. Castanotto, D. and J.J. Rossi, *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*. Nature, 2009. 457(7228): p. 426-33.

104. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet, 2007. 8(3): p. 173-84.
105. McNamara, J.O., 2nd, et al., *Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras*. Nat Biotechnol, 2006. 24(8): p. 1005-15.
106. Kurreck, J., *RNA interference: from basic research to therapeutic applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(8): p. 1378-98.
107. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.
108. Lupold, S.E., et al., *Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen*. Cancer Res, 2002. 62(14): p. 4029-33.
109. Chu, T.C., et al., *Aptamer mediated siRNA delivery*. Nucleic Acids Res, 2006. 34(10): p. e73.
110. Dassie, J.P., et al., *Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors*. Nat Biotechnol, 2009. 27(9): p. 839-49.
111. Chu, T.C., et al., *Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells*. Cancer Res, 2006. 66(12): p. 5989-92.
112. Zhang, L., et al., *Co-delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs from nanoparticle-aptamer bioconjugates*. ChemMedChem, 2007. 2(9): p. 1268-71.
113. Zhou, J., et al., *Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy*. Mol Ther, 2008. 16(8): p. 1481-9.
114. Zhou, J. and J.J. Rossi, *Aptamer-targeted cell-specific RNA interference*. Silence. 1(1): p. 4.
115. Zhou, J. and J.J. Rossi, *The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers*. Curr Top Med Chem, 2009. 9(12): p. 1144-57.
116. Hicke, B.J., et al., *Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein*. J Biol Chem, 2001. 276(52): p. 48644-54.
117. Hicke, B.J., et al., *Tumor targeting by an aptamer*. J Nucl Med, 2006. 47(4): p. 668-78.
118. Wullner, U., et al., *Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. 8(7): p. 554-65.
119. Guo, P., *RNA nanotechnology: engineering, assembly and applications in detection, gene delivery and therapy*. J Nanosci Nanotechnol, 2005. 5(12): p. 1964-82.
120. Guo, S., et al., *Specific delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA*. Hum Gene Ther, 2005. 16(9): p. 1097-109.
121. Khaled, A., et al., *Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology*. Nano Lett, 2005. 5(9): p. 1797-808.
122. Li, N., et al., *Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells*. Chem Commun (Camb). 46(3): p. 392-4.
123. Kang, H., et al., *A liposome-based nanostructure for aptamer directed delivery*. Chem Commun (Camb). 46(2): p. 249-51.
124. Chen, C.H., et al., *Aptamer-based endocytosis of a lysosomal enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(41): p. 15908-13.
125. Zhou, J., B. Soontornworajit, and Y. Wang, *A temperature-responsive antibody-like nanostructure*. Biomacromolecules. 11(8): p. 2087-93.

126. Soontornworajit, B. and Y. Wang, *Nucleic acid aptamers for clinical diagnosis: cell detection and molecular imaging*. Anal Bioanal Chem. 399(4): p. 1591-9.
127. Shigdar, S., et al., *An RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)*. Cancer Sci.
128. Shi, H., *Activatable aptamer probe for contrast-enhanced in vivo cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration*. PNAS, 2011.
129. Fischer, M., et al., *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. 15(2): p. 142-5.
130. Rose-John, S., *Universität Kiel*.
<http://www.uni-kiel.de/Biochemie/unterverzeichnisse/rose.html>.
131. Schroers, A., et al., *Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane*. Protein Sci, 2005. 14(3): p. 783-90.
132. 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.
133. Chen, Q., et al., *Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism*. Nat Immunol, 2006. 7(12): p. 1299-308.
134. Lin, M., et al., *Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling*. Biochem J, 2006. 398(3): p. 577-83.
135. Vollmer, P., et al., *A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding*. Eur J Biochem, 1999. 263(2): p. 438-46.
136. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
137. Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(13): p. 3406-15.
138. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>.
139. Zivcovic, T., *Interleukin-6-Rezeptor-spezifische DNA-Aptamere*. 2010.
140. Xiao, Z., et al., *Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection*. Chemistry, 2008. 14(6): p. 1769-75.
141. Larregina, A.T., et al., *Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants*. Immunology, 1997. 91(2): p. 303-13.
142. Ambion, http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html.
143. 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.
144. Sousa, R. and S. Mukherjee, *T7 RNA polymerase*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003. 73: p. 1-41.
145. Frank, R. and H. Koster, *DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide-gels*. Nucleic Acids Res, 1979. 6(6): p. 2069-87.
146. Chen, L., et al., *IL-17RA aptamer-mediated repression of IL-6 inhibits synovium inflammation in a murine model of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage.
147. Hermann, T. and D.J. Patel, *Adaptive recognition by nucleic acid aptamers*. Science, 2000. 287(5454): p. 820-5.
148. Meyer, H., *SPR-Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung*.

149. Meyer, C., *Aptamers specific for the interleukin-6 receptor*, in *Treffen der Norddeutschen Biophysiker, Posterpräsentation*. 2010.
150. Wochner, A., et al., *A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines*. *Anal Biochem*, 2008. 373(1): p. 34-42.
151. Miyakawa, S., et al., *Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G*. *RNA*, 2008. 14(6): p. 1154-63.
152. Sousa, R. and R. Padilla, *A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase*. *EMBO J*, 1995. 14(18): p. 4609-21.
153. Zhang, D.H., et al., *Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors*. *Biochemistry*. 49(21): p. 4554-63.
154. Sacca, B., L. Lacroix, and J.L. Mergny, *The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(4): p. 1182-92.
155. Hartmann, R.K., *Handbook of RNA Biochemistry*. 2005.
156. Perreault, D.M., *Der Mechanismus der RNA-Spaltung durch Umesterung -eine vereinheitlichende Analyse des aktuellen Diskussionsstandes*. *Angewandte Chemie*, 1997.
157. Haupenthal, J., et al., *RNAse A-like enzymes in serum inhibit the anti-neoplastic activity of siRNA targeting polo-like kinase 1*. *Int J Cancer*, 2007. 121(1): p. 206-10.
158. Haupenthal, J., et al., *Inhibition of RNAse A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum*. *Biochem Pharmacol*, 2006. 71(5): p. 702-10.
159. 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.
160. Adler, A., et al., *Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008. 11(1): p. 16-23.
161. Marro, M.L., et al., *Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN-gamma-inducible CXCL10 chemokine*. *Biochemistry*, 2005. 44(23): p. 8449-60.
162. Tang, Z., et al., *Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells*. *Anal Chem*, 2007. 79(13): p. 4900-7.
163. Goldstein, J.L., et al., *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system*. *Annu Rev Cell Biol*, 1985. 1: p. 1-39.
164. Sorkin, A. and M. von Zastrow, *Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(9): p. 609-22.
165. Choi, S.H., J.M. Mendrola, and M.A. Lemmon, *EGF-independent activation of cell-surface EGF receptors harboring mutations found in gefitinib-sensitive lung cancer*. *Oncogene*, 2007. 26(11): p. 1567-76.
166. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Families of serine peptidases*. *Methods Enzymol*, 1994. 244: p. 19-61.
167. Mullberg, J., et al., *The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site*. *J Immunol*, 1994. 152(10): p. 4958-68.
168. Raines, R.T., *Ribonuclease A*. *Chem Rev*, 1998. 98(3): p. 1045-1066.
169. Pace, C.N., *Ribonuclease T1: Structure, Function and Stability*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991.
170. Li, W., et al., *Real-time imaging of protein internalization using aptamer conjugates*. *Anal Chem*, 2008. 80(13): p. 5002-8.

171. Dautry-Varsat, A., A. Ciechanover, and H.F. Lodish, *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(8): p. 2258-62.
172. McNamara, J.O., et al., *Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice*. J Clin Invest, 2008. 118(1): p. 376-86.
173. Cerchia, L., et al., *Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase*. PLoS Biol, 2005. 3(4): p. e123.
174. Kurreck, J., *siRNA efficiency: structure or sequence-that is the question*. J Biomed Biotechnol, 2006. 2006(4): p. 83757.
175. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. 10(2): p. 126-39.
176. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. Science, 2006. 311(5758): p. 195-8.
177. Vermeulen, A., et al., *The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency*. RNA, 2005. 11(5): p. 674-82.
178. Konnikova, L., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells*. Cancer Res, 2005. 65(15): p. 6516-20.
179. Park, O.K., et al., *Dimer stability as a determinant of differential DNA binding activity of Stat3 isoforms*. J Biol Chem, 2000. 275(41): p. 32244-9.
180. Shao, Y., et al., *Effect of target secondary structure on RNAi efficiency*. RNA, 2007. 13(10): p. 1631-40.
181. Gopinath, S.C., *Mapping of RNA-protein interactions*. Anal Chim Acta, 2009. 636(2): p. 117-28.
182. Shirokikh, N.E., S. Agalarov, and A.S. Spirin, *Chemical and enzymatic probing of spatial structure of the omega leader of tobacco mosaic virus RNA*. Biochemistry (Mosc). 75(4): p. 405-11.
183. Sakamoto, T., et al., *NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(2): p. 745-54.
184. Mayne, J., et al., *Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans*. Lipids Health Dis, 2008. 7: p. 22.

Anhang

GHS-Verordnung

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

Sicherheitshinweise für Gefahrstoffe

H-Sätze (Hazard Statements)

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

P-Sätze (Precautionary Statements)

P201:	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P210:	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P261:	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P280:	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P301:	Bei Verschlucken:
P302:	Bei Berührung mit der Haut:
P304:	Bei Einatmen:
P305:	Bei Kontakt mit den Augen:

P308:	Bei Exposition oder falls betroffen:
P311:	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P312:	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P313:	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P330:	Mund ausspülen.
P331:	Kein Erbrechen herbeiführen.
P338:	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340:	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P341:	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342:	Bei Symptomen der Atemwege:
P351:	Einige min lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352:	Mit viel Wasser und Seife waschen.

Gefahrstoffinformationen

Tabelle 7-1: Gefahrstoffinformationen

Verbindung	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid		H301 H312 H315 H317 H319 H332 H340 H350 H361f H372	P280 P302 + P352 P305 + P351 + P338
Aminohexansäure		H315 H319 H335	P261 P280 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P304+P340
APS		H272 H302 H315 H317 H319 H334 H335	P280 P305 + P351 + P338 P302 + P352 P304 + P341 P342 + P311
BCIP		H315 H319 H335	P261 P280 P301 + P312 P304 + P340
Bisacrylamid		H302	

Chloroform		H302 H315 H351 H373	P302 + P352 P314
DTT		H302 H315 H319 H335	P261 P280 P301 + P312 P304 + P340
DMF		H226 H312 H319 H332 H360D	P201 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P308 + P313
Essigsäure		H226 H314	P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338
Ethanol		H225	P210 P233
EtBr		H332 H341	P281 P308 + P313
Isoamylalkohol		H226 H332 H335	P210 P304+P340
Isopropanol		H225 H319 H336	P210 P261 P305 + P351 + P338
Methanol		H225 H301 H311 H331 H370	P210 P233 P280 P302 + P352
NaOH		H290 H314	P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338

NBT		H302 H319	P280 P301+P312 P305 + P351 + P338
Phenol		H301 H311 H314 H331 H341 H373	P260 P264 P280 P301+ P310+ P330+ P331 P302 + P352 P303+ P361+ P353 P304+P340 P305 + P351 + P338
Salzsäure konz.		H290 H314 H335	P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338
SDS		H302 H312 H315 H319 H335	P261 P280 P301+P312 P304+P340 P302 + P352 P305 + P351 + P338
TEMED		H225 H302 H314 H332	P210 P233 P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338
Tris		H315 H319 H335	P261 P280 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P304+P340
Trypanblau		H350	P201 P308 + P313
Xylen Cyanol FF		H315 H319 H335	P261 P280 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P304+P340

Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I & II

Tabelle 7-2: KMR-Substanzen

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	30-40%-ige, wässrige Lösungen zur Polymerisation: 300 mL	K1B, M1B, RF2
56-65-5	Adenosintriphosphat	radioaktives Isotop (^{32}P) zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren Menge: 100 μL	
72-57-1	Cycloheximid	wässrige Lösung in der Zellkultur (1mg/mL) Menge: 30 μL	M2, RE1B
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/mL wässrige Lösungen zur Färbung von Polyacrylamidgelen (0,5 mg/mL Endkonzentration): 150 μL	M2
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von Western Blots 1,5 mL	RE1B
108-95-2	Phenol	~100% für die RNA-Isolation: 25 mL	K2

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn für die Vergabe dieses Themas, für die auch in schwierigen Zeiten immerwährende Unterstützung und für sein konstantes Vertrauen in mich und meine wissenschaftliche Arbeit, bedanken.

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

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

Ein großer Dank gebührt Frau Dr. Cindy Meyer für ihre gute Betreuung und Geduld, für ihre stets aufmunternden Worte, ihre Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. Nicolas Piganeau und Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller, die für alle Probleme immer ein offenes Ohr hatten und mich stets fachlich unterstützt haben. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. JProf Andrea Rentmeister für ihre guten Ratschläge bedanken.

Bei Frau Eileen Magbanua möchte ich mich für die angenehme, unkomplizierte und produktive Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt bedanken.

Jan-Hinnerk Jarck danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Durchführung der SPR-Experimente.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe für die fröhliche und kollegiale Atmosphäre im Labor sowie die immer gewährte Hilfestellung bedanken. Insbesondere Eileen, Anna, Kirstin, Christina, Sven und Volker danke ich für ihre Unterstützung und viele lustige Momente. Ebenso gilt dies für Frau Dr. Tijana Zivkovic, bei der ich mich zudem fürs Korrekturlesen bedanken möchte.

Frau Elena Wasiljew, Frau Margot Binnewies und Frau Daniela Otto danke ich für ihre freundliche Hilfestellung in vielerlei Hinsicht.

Danken möchte ich auch allen Studenten und Auszubildenden, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders zu erwähnen sind hierbei Josephin, Vera, Fazi und Birte.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden außerhalb des Labors ganz herzlich für ihre moralische Unterstützung und Aufmunterung bedanken, ihr habt mir sehr viel Kraft gegeben! Insbesondere Nina, Manu, Janina, Susanne, Julia, Mandy und Ulrike was hätte ich nur ohne Euch getan?!

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Freund Henrik, der mich mit viel Geduld und Liebe unterstützt hat.

Zum Schluss gilt mein spezieller Dank auch meiner Mutter sowie meiner Schwester, die mir über all die Jahre stets den Rücken gestärkt haben und mir in jeglicher Hinsicht zur Seite standen.

Selbstständigkeitserklärung

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

Hamburg, den 28. März 2011

Katja Eydelor